

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

Úloha signální dráhy Jak/STAT v buněčné senescenci
(The role of Jak/STAT signaling pathway in cellular senescence)

Diplomová práce

Bc. Markéta Černožorská

Oddělení integrity genomu, ÚMG AV ČR

Praha 2009

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie se zaměřením na molekulární
biologii eukaryotní buňky

Forma studia: prezenční

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Zdeněk Hodný, PhD.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala pod vedením školitele MUDr. Zdeňka Hodného, PhD. při Oddělení integrity genomu ÚMG AV ČR samostatně a za použití uvedených literárních pramenů.

Dne 4.9.2009 v Praze

.....

Poděkování

Tímto bych chtěla především poděkovat školiteli Dr. Zdeňku Hodnému za odborné vedení a trpělivost při práci. Dále bych ráda poděkovala Dr. Haně Hanzlíkové a Kamile Burdové za cenné rady, Pavlu Moudrému za podporu, Markétě Vančurové za originální humor a zbytku laboratoře v oddělení integrity genomu za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě patří má vděčnost za podporu také Honzovi Outlému.

Souhrn

Buněčná senescence představuje specifickou zástavu buněčného cyklu v reakci na stres *in vitro*. Původně byla popsána v souvislosti se stárnutím buněk, jež je definované Hayflickovým limitem. Od té doby bylo objeveno, že senescenci lze vyvolat různými stimuly, kterým je společné poškození DNA. Mezi ně patří např. oxidační stres, aberantní aktivace onkogenů a působení genotoxických látek. Senescentní buňky mění fenotyp morfologicky i biochemicky, zvětšují cytoplazmu, aktivují inhibitory buněčného cyklu, exprimují nádorové supresory a také sekretují imunomodulační cytokiny/chemokiny, které pro buňky nejsou původní. Tyto látky spouštějí mnoho kaskád, např. signální dráhy Jak/STAT, které jsou indukovány v odpovědi na virovou infekci nebo zánět. Senescentní buňky byly nalezeny také *in vivo* v nádorové tkáni, která sama o sobě produkuje změněný profil cytokinů. Diplomová práce se zabývá úlohou interferonové signální dráhy Jak/STAT v indukci předčasné buněčné senescence vyvolané působením chemických látek, které jsou používány v nádorové chemoterapii. Získané výsledky mohou pomoci v porozumnění vztahu mezi tumorogenezí a buněčnou senescencí.

Klíčová slova:

buněčná senescence, signální dráha Jak/STAT, promyelocytický leukemický protein, tymidin, nestabilita genomu, odpověď na poškození DNA

Abstract

Proliferating human cells cultivated *in vitro* after certain number of population doublings withdraw from the cell cycle and enter a specific state termed replicative cellular senescence. Lately, several other forms of senescence independent of the proliferative history and telomere shortening were described. This is called premature senescence, and can be elicited by exposure of cells to aberrant mitogenic or oncogenic signals, to oxidative stress or to variety of chemically and functionally unrelated DNA damaging agents. Senescent cells alter their morphology and expression pattern. This complex phenotype is characterized by enlarged cytoplasm, activation of cell cycle inhibitors, expression of tumor suppressors and profound changes in cell secretory phenotype. These cytokines/chemokines induce many different cascades, for example Jak/STAT signaling pathway, that are activated in response to viral infection or inflammation. Senescent cells were found also *in vivo* in the tumor tissue that produces altered cytokines itself. This diploma thesis inquires into the role of interferon-Jak/STAT signaling pathway in premature cellular senescence induced by genotoxic agents that are often used in chemotherapy. Obtained results might help to understand the complexity of tumorigenesis and senescence.

Key words:

cellular senescence, Jak/STAT signaling pathway, promyelocytic leukemia protein, thymidine, genomic instability, DNA damage response

Obsah

SOUHRN	1
ABSTRACT.....	5
OBSAH	6
SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD.....	13
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	15
2.1 NÁDOROVÉ ONEMOCNĚNÍ.....	15
2.1.1 <i>Nestabilita genomu</i>	16
2.1.1.1 Sekvenční nestabilita genomu	17
2.1.1.2 Chromozomální nestabilita genomu.....	18
2.1.1.2.1 Strukturní nestabilita chromozomů	18
2.1.1.2.2 Numerická nestabilita chromozomů	18
2.2 POŠKOZENÍ DNA.....	19
2.2.1 <i>Buněčná odpověď na poškození DNA</i>	20
2.2.1.1 Senzory poškození DNA.....	21
2.2.1.2 Mediátory poškození DNA	22
2.2.1.3 Transduktory poškození DNA	22
2.2.1.3.1 Ataxia telangiectasia mutated	23
2.2.1.3.1.1 γ H2AX	23
2.2.1.3.2 Ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related	24
2.2.1.4 Efektory poškození DNA	25
2.2.1.4.1 Nádorový supresor p53	26
2.3 BUNĚČNÁ SENESENCE	28
2.3.1 <i>Replikační buněčná senescence</i>	28
2.3.2 <i>Předčasná buněčná senescence</i>	29
2.3.2.1 Společná charakteristika.....	30
2.3.2.2 Onkogeny-indukovaná předčasná senescence.....	32
2.3.2.3 Předčasná buněčná senescence indukovaná oxidačním stresem.....	32
2.3.2.4 Chemicky indukovaná předčasná senescence	33
2.4 BUNĚČNÝ CYKLUS SENESENTNÍ BUŇKY.....	34
2.4.1 <i>Kontrolní bod G1/S</i>	35
2.4.2 <i>Kontrolní body S-fáze</i>	36
2.4.3 <i>Tkáňové mikroprostředí senescentních buněk</i>	37
2.5 SIGNÁLNÍ DRÁHY JAK/STAT.....	38
2.5.1 <i>Obecný mechanismus aktivace Jak/STAT</i>	38
2.5.2 <i>Regulace JAK/STAT cytokiny</i>	40
2.5.2.1 Interferony a geny stimulované interferony	41
2.5.2.1.1 Aktivace STAT1	41
2.5.2.2 Interferonem regulované faktory.....	43
2.5.2.3 STAT2 a další členové rodiny STAT	44
2.5.2.4 Inhibitory signální dráhy Jak/STAT	45
2.6 PROTEIN MXA.....	46
2.7 PROMYELOCYTICKÝ LEUKEMICKÝ PROTEIN	47
2.7.1 <i>Struktura proteinu PML</i>	47
2.7.1.1 Izoformy PML	48
2.7.2 <i>Jaderná tělíska PML</i>	49
2.7.3 <i>Biologické funkce PML</i>	49
2.7.3.1 Struktura PML tělísek	50
2.7.3.2 Regulace PML	51
2.7.4 <i>Spojení PML NBs, interferonové dráhy a p53</i>	51
3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	54
4 MATERIÁL A METODY	55
4.1 MATERIÁL	55
4.1.1 <i>Materiál a Chemikálie</i>	55
4.1.2 <i>Použité protilátky</i>	56
4.1.3 <i>Přístrojové vybavení</i>	57
4.2 METODY	58

4.2.1	Tkáňové kultury.....	58
4.2.1.1	Buněčné linie	58
4.2.1.2	Příprava médií	59
4.2.1.3	Kultivace tkáňových kultur	59
4.2.2	Detekce exprese β -galaktosidázy	60
4.2.3	Nepřímé imunofluorescenční značení	61
4.2.4	Immunoblot	61
4.2.4.1	Příprava buněčných lysátů	61
4.2.4.2	Stanovení koncentrace proteinů	62
4.2.4.3	Denaturující polyakrylamidová gelová elektroforéza.....	62
4.2.4.4	Imunoblot a detekce	63
4.2.5	Kvantitativní Real Time polymerázová řetězcová reakce.....	64
4.2.5.1	Izolace totální RNA	65
4.2.5.2	Reverzně transkripční PCR	66
4.2.5.3	qRT PCR.....	66
VÝSLEDKY		67
4.3	TYMIDIN INDUKUJE PŘEDČASNOU BUNĚČNOU SENESCENCI A EXPRESI SA-B-GALAKTOSIDÁZY	67
4.4	TYMIDIN VYVOLÁVÁ PERZISTENTNÍ ODPOVĚĎ NA POŠKOZENÍ DNA	70
4.5	POČET JADERNÝCH TĚLÍSEK PML A HLADINA PML SE ZVEDÁ V BUŇKÁCH VYSTAVENÝCH TMD	75
4.6	ZÁVISLOST FORMACE JADERNÝCH TĚLÍSEK PML NA P53	78
4.7	HLADINA PML NENÍ OVLIVNĚNA EXPRESÍ DOMINANTNĚ NEGATIVNÍ FORMY P53.....	82
4.8	VÝVOJ TYMIDINEM-INDUKOVANÉ SENESCENCE NENÍ ZÁVISLÝ NA PROTEINU P53	84
4.9	TVORBA FOKUSŮ POŠKOZENÍ DNA NENÍ ZÁVISLÁ NA P53.....	86
4.10	BUŇKY V TYMIDINEM-INDUKOVANÉ SENESCENCI MAJÍ ZVÝŠENÉ HLADINY PROTEINŮ ZE SKUPINY INTERFERON-STIMULOVANÝCH GENŮ	88
4.11	BUNĚČNÁ DISTRIBUCE MxA V SENESCENCI INDUKOVANÉ TYMIDINEM.....	90
4.12	TYMIDIN ZVYŠUJE HLADINU mRNA PML A IRF-1	92
4.13	TYMIDIN AKTIVUJE KOMPONENTY SIGNÁLNÍ DRÁHY JAK/STAT	93
5	ZÁVĚR.....	97
6	DISKUZE.....	98
6.1	INDUKCE PŘEDČASNÉ BUNĚČNÉ SENESCENCE PO TMD	98
6.2	TYMIDIN VYVOLÁVÁ PERZISTENTNÍ ODPOVĚĎ NA POŠKOZENÍ DNA	100
6.3	INDUKCE PML V TYMIDINEM-INDUKOVANÉ SENESCENCI.....	102
6.4	P53 NEHRAJE ROLI V EXPRESI PML INDUKOVANÉ TMD.....	103
6.5	TYMIDINEM-INDUKOVANÉ SENESCENCE NENÍ ZÁVISLÁ NA P53	104
6.6	TVORBA FOKUSŮ POŠKOZENÍ DNA NENÍ ZÁVISLÁ NA P53.....	105
6.7	INDUKCE INTERFERONEM STIMULOVANÝCH GENŮ V SENESCENCI INDUKOVANÉ TYMIDINEM.....	105
6.8	POTENCIÁLNÍ LOKALIZACE MxA V OBLASTI JADERNÉHO PÓRU	106
6.9	INDUKCE PML V TYMIDINEM INDUKOVANÉ SENESCENCI	107
7	SEZNAM LITERATURY	111

Seznam zkratek

Zkratka	Anglický název	Český název
53BP1	p53 <u>B</u> inding <u>P</u> rotein <u>1</u>	vazebný protein p53
AAF	IFN α - <u>A</u> ctivated <u>F</u> actor	faktor aktivovaný IFN α
APC/C	<u>A</u> naphase- <u>P</u> romoting <u>C</u> omplex/ <u>C</u> yclosome	anafázní promoční komplex/cyklozóm
APS	<u>A</u> mmonium <u>P</u> ersulphate	persulfát amonný
ASF1a	<u>A</u> nti- <u>S</u> ilencing <u>F</u> actor <u>1a</u>	faktor 1a proti umlčování
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection	americká sbírka typů buněčných kultur
ATM	<u>A</u> taxia <u>T</u> elangiectasia <u>M</u> utated	--
ATR	<u>A</u> taxia <u>T</u> elangiectasia mutated and <u>R</u> ad- 3-related	--
ATRIP	<u>A</u> TR- <u>I</u> nteracting <u>P</u> rotein	protein interagující s ATR
BCA	<u>B</u> i <u>C</u> inchonic acid <u>A</u> ssay	--
BER	<u>B</u> ase <u>E</u> xcision <u>R</u> epair	excizní oprava bází
BLM	<u>B</u> Loo <u>M</u> syndrom helicase	helicáza Bloomův syndrom
BRCA1, BRCA2	<u>B</u> reast <u>C</u> arcinoma <u>1</u> a <u>2</u>	gen pro hereditární karcinom prsu 1 a 2
BRCT	<u>B</u> RCA1 <u>C</u> - <u>T</u> erminus repeat domain	doména opakujícího se C-konce proteinu rakoviny prsu
BrdU	<u>B</u> Romo <u>D</u> eoxy <u>U</u> ridine	5'-bromo-2'-deoxyuridin
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin	bovinní sérový albumin
Cdc25	<u>C</u> ell <u>d</u> ivision <u>c</u> ycle <u>25</u> (A,B,C)	--
CDK	<u>C</u> yclin- <u>D</u> ependent <u>K</u> inase	kináza závislá na cyklinu
cDNA	<u>C</u> omplementary <u>D</u> eoxyribo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CHK1, 2	<u>C</u> Hcheckpoint <u>K</u> inase <u>1</u> a <u>2</u>	kinázy 1 a 2 kontrolního bodu
CIP	<u>C</u> DK <u>I</u> nhibitory <u>P</u> roteins	inhibiční proteiny CDK
CK-2	<u>C</u> asein <u>K</u> inase <u>2</u>	casein-kináza 2
CREB	cAMP enhancer binding protein- <u>B</u> inding <u>P</u> rotein	protein vázající CREB
Ct	<u>C</u> ycle <u>T</u> reshold	hranice cyklu
cyc/CDK	<u>C</u> Yclin/ <u>C</u> DK	komplex cyklin/CDK
CyPNs	<u>C</u> Ytoplasmic assemblies of <u>P</u> ML and <u>N</u> ucleoporin <u>S</u>	cytoplazmatické komplexy PML a nukleoporinů
DAPI	4',6- <u>D</u> i <u>A</u> midino-2- <u>P</u> henyl <u>I</u> ndole	4',6-diamidino-2-fenylindol
DAXX	<u>D</u> eath <u>A</u> ssociated protein 6	--
DD H ₂ O	redetil steril water	redestilovaná sterilní voda
DDR	<u>D</u> NA <u>D</u> amage <u>R</u> esponse	odpověď na poškození DNA
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium	medium DMEM
DMSO	<u>D</u> i <u>M</u> ethyl <u>S</u> ulph <u>O</u> xide	dimetylsulfoxid
DNA-PK	<u>D</u> NA- <u>P</u> rotein- <u>K</u> inase	DNA proteinová kináza
DSB	Double-Strand Break	dvouřetězcový zlom
E2F	<u>E</u> karyotic transkription <u>F</u> actor <u>2</u>	eukaryotický transkripční faktor 2
EDTA	<u>E</u> thylene <u>D</u> iamine <u>T</u> etraacetic <u>A</u> cid	kyselina etylendiaminotetraoctová
EGF	<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor	epidermální růstový faktor
eIF4-BP1	<u>E</u> karyotic- <u>I</u> nitiation- <u>F</u> actor <u>4</u> - <u>B</u> inding	vazebný protein eukaryotního

	<u>Protein 1</u>	iniciačního faktoru translace 4
EPO	<u>E</u> rythropoetin	erythropoetin
ER	<u>E</u> ndoplasmatic <u>R</u> eticulum	endoplazmatické retikulum
EYA	<u>E</u> Yes <u>A</u> bsent	gen mutanty bez očí
FBS	<u>F</u> oetal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum	fetální kravské sérum
FBS	<u>F</u> oetal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum	fetální kravské sérum
G1, G2	<u>G</u> ap <u>1</u> , <u>G</u> ap <u>2</u>	--
GAF	<u>I</u> FN γ - <u>A</u> ctivated <u>F</u> actor	faktor aktivovaný IFN γ
GAPDH	<u>G</u> lycer <u>A</u> ldehyde-3- <u>P</u> hosphate <u>D</u> e <u>H</u> ydrogenase	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GAS	<u>G</u> amma <u>A</u> ctivated <u>S</u> ite	IFN γ aktivované místo
GF	<u>G</u> rowth <u>F</u> actor	růstový hormon
GM-CSF	<u>G</u> ranulocyte- <u>M</u> onocyte <u>C</u> olony <u>S</u> timulating <u>F</u> actor	faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů
HAUSP	<u>H</u> erpes-virus <u>A</u> ssociated <u>U</u> biquitin <u>S</u> pecific <u>P</u> rotease	specifická ubiquitin-proteáza asociovaná s Herpes virem
HDAC	<u>H</u> istone <u>D</u> e <u>A</u> cetylases	histon deacetylázy
HDM2	<u>H</u> uman <u>D</u> ouble <u>M</u> inute <u>2</u>	--
HIPK2	<u>H</u> omeodomaine- <u>I</u> nteracting <u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>2</u>	proteinová kináza 2 interagující s homoedoménou
HIRA	<u>H</u> iston <u>R</u> egulator	regulátor histonu
HIV	<u>H</u> uman <u>I</u> mmunodeficiency <u>V</u> irus	virus lidské imunodeficiency
HP1	<u>H</u> eterochromatin <u>P</u> rotein <u>1</u>	heterochromatinový protein 1
HPV	<u>H</u> uman <u>P</u> apilloma <u>V</u> irus	lidský papiloma-virus
HR	<u>H</u> omology <u>R</u> ecombination	homologní rekombinace
HRs	<u>H</u> omogenously <u>S</u> taining <u>R</u> egions	homogenně značené regiony
HTLV	<u>H</u> uman <u>T</u> - <u>L</u> eukemia <u>V</u> irus	virus lidské T-leukémie
Hus1	Checkpoint homolog 1	--
IB	<u>I</u> mmuno <u>B</u> lot analysis	imunoblotová analýza
ICSBP	<u>C</u> onsensus- <u>S</u> equence IFN <u>B</u> inding <u>P</u> rotein	protein vázající konsenzuální sekvence IFN
IF	<u>I</u> mmuno <u>F</u> luorescence analysis	imuno fluorescenční analýza
IFNs	<u>I</u> nter <u>F</u> ero <u>N</u> s	interferony
IGF	<u>I</u> nsuline-like <u>G</u> rowth <u>F</u> actor	růstový faktor odvozený od inzulinu
IKK/	<u>I</u> nhibitor <u>K</u> appa <u>B</u> <u>K</u> inase/ <u>N</u> uclear	inhibitor kinázy kappaB/jaderný faktor
NF- κ B	<u>F</u> actor <u>K</u> appa <u>B</u>	kappaB
ILs	<u>I</u> nter <u>L</u> eukins	interleukiny
INK4	<u>I</u> nhibitor of <u>K</u> inase <u>4</u>	inhibitor kinázy 4
IRF	<u>I</u> nterferon <u>R</u> egulated <u>F</u> actor	interferon-regulační faktor
ISGF3	<u>I</u> FN- <u>S</u> timulated <u>G</u> ene <u>F</u> actor <u>3</u>	faktor 3 genů stimulovaných interferony
ISGs	<u>I</u> nterferon- <u>S</u> timulated <u>G</u> enes	interferon stimulované geny
ISRE	<u>I</u> nterferon <u>S</u> ensitive <u>R</u> esponsive <u>E</u> lement	interferon senzitivní responzivní element
Jak	<u>J</u> anus <u>K</u> inase	--
Kap-1	<u>K</u> RAB domain- <u>A</u> ssociated <u>P</u> rotein- <u>1</u>	protein 1 spojený s doménou KRAB
MAPK	<u>M</u> itogen <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase	proteinová kináza aktivovaná mitogeny
MAPPs	<u>M</u> itotic <u>A</u> cumulation of <u>P</u> ML <u>P</u> rotein <u>S</u>	mitotická akumulace proteinu PML
MDC1	<u>M</u> ediator of DNA <u>D</u> amage <u>C</u> heckpoint <u>1</u>	mediátor kontrolního bodu poškozené DNA 1
MMR	<u>M</u> ismatch <u>R</u> epair	oprava chybného párování bází

Mre11	<u>M</u> itotic <u>R</u> ecombination protein 11	protein 11 mitotické rekombinace
mTOR	<u>M</u> ammalian <u>T</u> arget of <u>R</u> apamycin	savčí protein odpovídající na rapamycin
Myd88	<u>M</u> Yeloid <u>D</u> ifferentiation primary response gene (88)	--
Nbs1	<u>N</u> ijmegen <u>B</u> reakage <u>S</u> yndrom 1	protein onemocnění Nijmegen <u>B</u> reakage <u>S</u> yndrom
ND 10	<u>N</u> uclear dots 10	jaderné tečky 10
NER	<u>N</u> ucleotide <u>E</u> xcision <u>R</u> epair	nukleotidová excizní oprava
NHEJ	<u>N</u> on- <u>H</u> omologous <u>E</u> nd <u>J</u> oining	spojení nehomologních konců DNA
PAI	<u>P</u> lasminogen <u>A</u> ctivator <u>I</u> nhibitor	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline	fosfátový solný pufr
PBS-T	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline-Tween20 (0,05%)	fosfátový solný pufr s 0,05% Tweenem 20
PCNA	<u>P</u> roliferating <u>C</u> ell <u>N</u> uclear <u>A</u> ntigen	jaderný antigen proliferujících buněk
PDDF	<u>P</u> ersistent <u>D</u> N <u>A</u> <u>D</u> amage <u>F</u> oci	perzistentní fokusy poškození DNA
PDGF	<u>P</u> latelet- <u>D</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor	růstový faktor odvozený od krevních destiček
PI3-K	<u>P</u> hosphatidyl <u>I</u> nositol-3- <u>K</u> inase	fosfatidylinositol-3-kináza
Plk	<u>P</u> olo-like kinase	kináza podobná rodině Polo
PIP2	<u>P</u> hosphatidyl <u>I</u> nositol-4,5-diPhosphate	fosfatidylinositol-4,5-difosfát
PIP3	<u>P</u> hosphatidyl <u>I</u> nositol-3,4,5-triPhosphate	fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PML	<u>P</u> ro <u>M</u> yelocytic <u>L</u> eukemic protein	promyelocytický leukemický protein
PML	<u>P</u> M <u>L</u> <u>N</u> uclear <u>B</u> odies	jaderná tělíska PML
NBs		
PODs	<u>P</u> M <u>L</u> <u>o</u> ncogenic <u>d</u> omains	onkogenní domény PML
PP1	<u>P</u> rotein <u>P</u> hosphatase 1	proteinová fosfatáza 1
PRC1	<u>P</u> olycomb <u>R</u> epressive <u>C</u> omplex 1	--
pRb	<u>R</u> etino <u>B</u> lastoma <u>P</u> rotein	protein retinoblastomu
PS	<u>P</u> remature cellular <u>S</u> enescence	předčasná buněčná senescence
PTEN	<u>P</u> hosphatase and Tensin homologue deleted on chromosom <u>T</u> EN	homolog fosfatázy a tensinu deletovaný na chromozomu 10
PTPáza	<u>P</u> rotein <u>T</u> yrosine <u>P</u> hosphatase	proteinová tyrozinová fosfatáza
qRT PCR	quantitative <u>R</u> eal <u>T</u> ime <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction	kvantitativní polymerázová řetězcová reakce v reálném čase
Rad1, 9, 17, 51	<u>R</u> ADiation senzitive mutant 1, 9, 17, 51	mutant citlivý na ozáření 1, 9, 17, 51
RFC	<u>R</u> eplication <u>F</u> actor <u>C</u>	replikační faktor C
RING	<u>R</u> eally <u>I</u> nteresting <u>N</u> ew <u>G</u> ene	skutečně zajímavý nový gen
RNA	<u>R</u> ibo <u>N</u> ucleic Acid	ribonukleová kyselina
mRNA	<u>M</u> essenger <u>R</u> NA	informační RNA
ROS	<u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies	reaktivní kyslíkové radikály
RP-A	<u>R</u> eplicative <u>P</u> rotein <u>A</u>	replikační protein A
RT	<u>R</u> oom <u>T</u> emperature	laboratorní teplota
SAHF	<u>S</u> enescence- <u>A</u> ssociated <u>H</u> eterochromatin <u>F</u> oci	se senescencí spojená heterochromatinizace
SA-β-Gal	<u>S</u> enescence- <u>A</u> ssociated β-Gal	se senescencí spojená β-galaktosidáza
SBD	<u>S</u> UMO <u>B</u> inding <u>D</u> omain	vazebná doména SUMO
SDS	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulphate	dodecylsulfát sodný
Sirt-1	<u>S</u> IRtuin <u>T</u> ype 1	protein Sirtuin typu 1
SMC1	<u>S</u> tructural <u>M</u> aintenance of <u>C</u> hromosomes 1	protein 1 pro udržení struktury chromozomů

SMG-1	member of PI3-K family kinase (ATX)	člen rodiny PI3-K
SNURF	<u>S</u> mall <u>N</u> uclear <u>R</u> ING <u>F</u> inger protein	malý jadérkový protein s doménou RING
SOCS	<u>S</u> uppressors of <u>C</u> ytokine <u>S</u> ignalling	supresory cytokinové signalizace
STAT1	<u>S</u> ignal <u>T</u> ransducer and <u>A</u> ctivator of <u>T</u> ranscription 1	signální transduktor a aktivátor transkripce 1
SUMO	<u>S</u> mall <u>U</u> biquitin-related <u>M</u> odifier	malý modifikátor podobný ubiquitinu
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin
Tip60	<u>T</u> at- <u>I</u> nteracting <u>P</u> rotein 6%	protein 60 interagující s Tat
TMD	<u>T</u> hy <u>M</u> i <u>D</u> ine	tymidin
TopBP1	<u>T</u> opoiso <u>m</u> erase II β - <u>B</u> inding <u>P</u> rotein <u>1</u>	vazebný protein topoizomerázy II β
TRIM	<u>T</u> R <u>I</u> partite <u>M</u> otif	tripartitní motiv
TNF	<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor	nádorový faktor nekrózy
Crk	v-crk protooncogen	virový protonkogen crk
WEE1	Mitoses inhibitor protein kinase	--
WICH	<u>W</u> STF- <u>I</u> SWI ATP-dependent <u>C</u> Hromatin-remodelling complex	WSTF-ISWI chromatin-remodelující komplex závislý na ATP
Wip-1	<u>W</u> ild-type p53- <u>I</u> nduced <u>P</u> hosphatase <u>1</u>	fosfatáza 1 indukovaná nemutovaným genem pro p53
WSTF	<u>W</u> illiams-Beuren <u>S</u> ndrome <u>T</u> ranscription <u>F</u> actor	transkripční faktor syndromu Williams- Beuren
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D- <u>G</u> ALactopyranoside	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D- galaktopyranosid

1 Úvod

Proliferující normální buňky kultivované *in vitro* podstupují specifickou zástavu buněčného cyklu, zvanou replikační buněčná senescence. Původně byla popsána v souvislosti s buněčným stárnutím jako důsledek zkrácení telomerických zakončení chromozomů. Později bylo objeveno, že ji lze vyvolat i nezávisle na narušení telomer.

Mezi stimuly, které indukují senescenci, se řadí oxidační stres vyvolaný působením reaktivních kyslíkových radikálů, aberantní aktivace onkogenní signalizace nebo expozice látkám, které vyvolávají poškození DNA. Tento typ senescence byl označen jako předčasná senescence a s replikačním typem sdílí mnoho vlastností.

Senescentní buňky se od normálních buněk odlišují morfologicky i biochemicky. Zvětšují cytoplazmu, snižují metabolismus a naproti tomu zvyšují expresi mnohých stresových proteinů, mezi které se řadí inhibitory buněčného cyklu (p21, p16, pRb), nádorové supresory (např. promyelocytický leukemický protein) a proteiny opravných mechanismů poškozené DNA.

Poškození DNA je považováno také za příčinu karcinogeneze. Nádorové buňky se kromě deregulace proliferace a programované buněčné smrti odlišují od normálních buněk rovněž pozměněnou sekrecí imunomodulačních cytokinů/chemokinů. Těmito látkami, které nejsou tkáni původní, ovlivňují své okolí pozitivně i negativně. Jedněmi z mnoha kaskád, které jsou cytokiny aktivovány, jsou také signální dráhy Jak/STAT. Ty jsou primárně indukovány v reakci na virovou infekci nebo zánět a spouští expresi mnoha proteinů uplatňujících se v protivirové nebo prozánětlivé odpovědi, ke které patří sekrece dalších cytokinů.

Bylo zjištěno, že se senescentní buňky vyskytují také *in vivo*, a to v nádorové tkáni. Jejich přítomnost může být vysvětlena jako důsledek působení cytokinů nádorových buněk nebo jako důsledek nereparovatelného poškození DNA, které nevyvolalo tumorogenezi. Protože však bylo také zjištěno, že podstoupit senescenci *in vitro* mohou i nádorové buňky samotné, vyvstává otázka, zda není senescence jedním z ochranných mechanismů před neřízeným neoplastickým růstem poškozených buněk. Senescentní buňky stejně jako nádorové produkují velké množství cytokinů, které nejsou tkáni vlastní. Produkované cytokiny operují v pozitivní parakrinní i autokrinní signalizaci, která ovlivňuje karcinogenezi, mohou tento proces podporovat nebo naopak představují bariéru karcinogeneze. Tyto skutečnosti propojují nádorové buňky se senescentními a otevírají

pole pro výzkum funkce senescentních buněk přítomných v nádorové tkáni s cílem nalézt způsob, kterým by bylo možné potlačit růst maligních nádorů.

Cílem teoretického úvodu je přiblížit nejnovější teoretické modely pro pochopení molekulárních příčin vzniku rakoviny a senescence. Biologové zabývající se touto otázkou denně publikují množství objevů, jež poskytují různé pohledy na stejnou problematiku. Vše se děje s cílem nalézt univerzální lék pro léčbu rakoviny. Laboratoř prof. Bártka se snaží přispět do tohoto výzkumu skrze pochopení molekulárních mechanismů oprav poškozené DNA a iniciace buněčné senescence, které se zdají být spojením mezi rakovinou a stárnutím.

Mnohé genotoxické látky jsou v současné době používány jako chemoterapeutika při léčbě různých typů rakoviny. Tyto látky mají vedlejší efekty na buňky, které nejsou jejich původním cílem. V diplomové práci se zabýváme indukcí buněčné senescence, která je zprostředkována chemickým poškozením DNA. Jednou z použitých látek je nukleosid tymidin, který není jako chemoterapeutikum používán a u něhož nebyla toxicita dosud popsána. Je to prekurzor DNA, jenž je buňkou přirozeně syntetizován a ve výzkumu používán k umělé synchronizaci buněčného cyklu savčích buněk.

Zjistili jsme, že tato látka vyvolává poškození DNA, vyvolává chemicky-indukovanou předčasnou senescenci a perzistentně aktivuje cytokinovou signální dráhu Jak/STAT.

2 Literární přehled

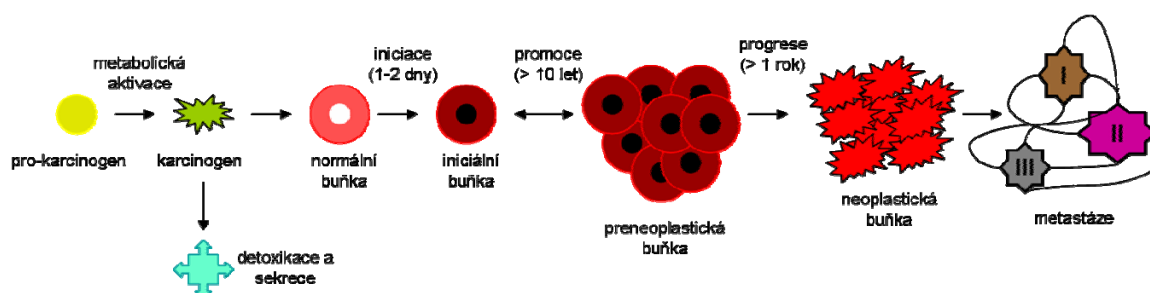
Cílem teoretické části diplomové práce je zhodnotit nejnovější poznatky ve výzkumu nádorové transformace. V současnosti je výzkum zaměřen hlavně na buněčné a biochemické mechanismy, které se uplatňují v příčinách karcinogeneze.

2.1 Nádorové onemocnění

Nádorové onemocnění lze přes jeho komplexnost zjednodušeně charakterizovat jako neregulovaný růst buněk spojený s poruchou kontrolních mechanismů a s alterací buněčné diferenciace (Dimri, G.P., 2005). Rakovinné buňky se od normálních buněk odlišují v morfologii, v karyotypu, ve vývoji metastáz, primární i získanou rezistencí k chemoterapeutikům a změněnou expresí proteinů.

Porozumět nádorovému bujení znamená vědět, kdy se mají normální buňky podle svého vnitřního programu množit a v čem je program nádorových buněk odlišný. Ačkoliv mechanismus karcinogeneze zůstává stále neobjasněn, v současné době převažuje na toto téma dvouhitová hypotéza, která popisuje její příčinu jako důsledek bodových mutací onkogenů a nádorových supresorů. Tento předpoklad má však stále více odpůrců a zastánců tzv. chromozomální teorie (Duesberg *et al.*, 2000). Podle této hypotézy rakovina vzniká v důsledku chromozomálních aberací, které jsou vyvolané poškozením DNA.

Proces maligní transformace je klinicky definován v pěti etapách (viz obr. 2-1). Zahájení procesu (iniciace) nastává účinkem zevních či vnitřních faktorů (karcinogenů), které vyvolají genetické změny. Spoluúčastí dalších podnětů dochází k pokroku ve vývoji (promoce), při kterém se objevují poruchy diferenciace buněk. V následujícím stadiu (konverze či transformace) vzniká další změnou maligní klon buněk. Transformované buňky ztrácejí schopnost odpovědi na regulační mechanismy, dochází k lokálnímu růstu nádoru (progrese) a posléze k rozšíření nádorových buněk mimo prvotní ložisko (metastáze) (shrnutí v Hanahan *et Weinberg*, 2000).



Obrázek 2-1: Schéma karcinogeneze (převzato a upraveno z přednášky prof. Marie Stiborové, Csc., Katedra biochemie, PŘF UK).

2.1.1 Nestabilita genomu

V posledním desetiletí se v oblasti výzkumu karcinogeneze vyskytuje pojem nestabilita genomu. To je proces ústící v neschopnost buňky segregovat do dceřiných jader identické kopie DNA (Schär P., 2001). Příčinou je akumulace genetických a epigenetických změn genů kódujících regulační proteiny buněčné proliferace a programované buněčné smrti (Lowe *et al.*, 2004). Nestabilita genomu je nyní považována za hlavní příčinu nádorové transformace buňky.

Genomová nestabilita se objevuje již v ranných stádiích transformace, další mutace jsou pak jejím důsledkem (Bartková *et al.*, 2005). Přestože jsou u nádorových buněk pozměněny ve výsledku desítky genů, odhaduje se, že pro transformaci je třeba nejméně 4-7 fatálních zásahů, které poskytují buňce výhodu samostatně. Integrita genomu, buněčná proliferace a buněčný růst jsou základní buněčné procesy, které udržují buňky viabilní. Jsou regulovány vnitřní sítí signálních drah, jež zahrnují kontrolní body buněčného cyklu, opravy DNA a programovanou buněčnou smrt (Kastan *et Bartek*, 2004).

K pochopení událostí, které jsou na počátku transformace, je třeba objasnit princip destabilizujících genetických změn (Schär P. 2001). Genomová nestabilita je úzce spojena se změnami regulace proliferace a programované buněčné smrti. Vztah mezi těmito procesy lze popsat třemi kauzálními fakty: (1) nestabilita genomu vytváří mutace, které deregulují programovanou buněčnou smrt, nejčastěji apoptózu. (2) Deregulace apoptózy vede ke vzniku genomové nestability. (3) Konkrétní protein může být zahrnut do regulace jak genomové nestability, tak apoptózy (shrnutí v Zhivotovsky *et Kroemer*, 2004). Deregulace apoptózy umožňuje selekci a klonální expanzi populace buněk s nestabilním genomem. Mezi hlavní deregulátory apoptózy patří dysfunkce telomer, polyploidie a aberantní mitóza. Příliš velká míra genomové nestability vede k rozsáhlým poškozením genomu a zániku buněk programovanou buněčnou smrtí. Proto u nádorových buněk existuje rovnováha mezi pozitivním a negativním dopadem akumulace mutací.

Patologické genetické změny jsou účinné pouze v genech tří typů: onkogenech, nádorových supresorech a genech integrity genomu (Vogelstein *et Kinzler*, 2004). Mutované onkogeny jsou geny, jejichž exprese je aktivována konstitutivně nebo za nepřírodných podmínek. Produktem těchto genů jsou onkoproteiny, které pozitivně regulují zejména buněčnou proliferaci. Pro aberantní aktivaci protoonkogenu v onkogen postačuje somatická mutace v jediné alele konkrétního genu. Tato aktivace je nejčastěji důsledkem chromozomálních aberací, genové amplifikace nebo intragenové mutace.

Kontinuální exprese onkogenu podporuje proliferaci buňky i v případě absence mitogenních signálů a to je jedno z hlavních nebezpečí pro rozvoj nádoru (Serrano *et al.*, 1997).

Nádorové supresory jsou geny, jejichž funkce musí být pro abnormální stav buňky naopak potlačena zcela a to v obou alelách. Základní úlohou produktů těchto genů, proteinových supresorů, v buněčném cyklu je inhibice progresu buněčného cyklu a podpora proapoptotických drah. Somatické mutace supresorů zahrnují bodové delece, inserce a epigenetické regulace.

Poslední skupina genů důležitých v procesu iniciace karcinogeneze je nazývána geny integrity genomu nebo také geny proteinů reparačních systémů DNA. Proteiny těchto genů ovlivňují mechanismy oprav poškození DNA. Jsou důležité v ochraně replikace a segregace chromosomů. Patří mezi ně jak nádorové supresory, tak protoonkogeny (Vogelstein *et al.*, 2004).

Důkazy o existenci genomové nestability poskytují studie demonstrující heterogenitu karyotypu různých druhů solidních nádorů a dědičné typy rakoviny, které vznikají z defektů genů integrity genomu (Mertens *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 1996). Genomová nestabilita se nezdá být důležitá jen pro neoplastický vývoj, může také umožnit rezistenci k chemoterapeutikům (Bartek *et al.*, 2007).

Nestabilita genomu byla dosud popsána ve dvou formách a několika druzích. Permanentní a transientní formy nestability jsou charakterizovány jako deficit kontrolních bodů mitózy, signalizace poškození a oprav DNA, funkce telomer a centrozómů. Transientní nestabilita genomu prezentuje poškození, které je buňka schopna opravit, ale permanentní nestabilita je spojena s trvalým poškozením DNA (Lengauer *et al.*, 1998). Mezi druhy patří nestabilita na úrovni sekvencí genů a na úrovni celých chromozomů, jež jsou vzájemně propojeny (viz obr. 2-2).

2.1.1.1 Sekvenční nestabilita genomu

Sekvenční nestabilita nebo také mikrosatelitní vzniká díky vysoké frekvenci bodových mutací, zejména mikrosatelitů. Příčinou je inaktivace opravných mechanismů chybného párování bází MMR (*Mismatch Repair*), delecí a insercí BER (*Base Excision Repair, excizní oprava bází*). Nestabilita související s defekty v kontrole poškození DNA je spojena s posílenou mitotickou rekombinací a chybnou segregací chromozomů (shrnutí v Lengauer *et al.*, 1998).

2.1.1.2 Chromozomální nestabilita genomu

Nestabilita na úrovni chromozomů představuje stav kontinuálně probíhajících chromozomálních mutací. Jejich příčinou je zvýšená četnost bodových mutací anebo snížená schopnost kontroly a oprav poškozené DNA formou rekombinace. Nejčastější mutace jsou v genech regulujících mitózu (např. v genech souvisejících s kondenzací chromozomů, s kohezí sesterských chromatid, se strukturou kinetochoru, s funkcí centrozómu a mikrotubulů dělicího vřeténka a dalších). U nádorových buněk se chromozomální nestabilita vyskytuje mnohem častěji než sekvenční nestabilita. Nestabilitu chromozomů lze ještě rozdělit na strukturní a numerickou ([shrnutí v Lengauer et al., 1998](#)).

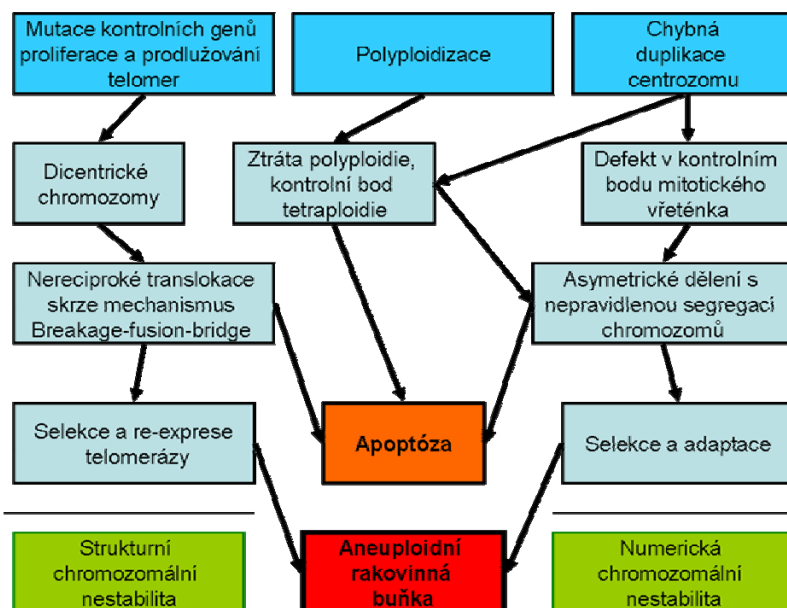
2.1.1.2.1 Strukturní nestabilita chromozomů

Strukturní nestabilita chromozomů je způsobena chybami v senzorech poškození DNA (viz 2.2.1.1) nebo mutacemi ve dvou základních systémech pro opravu dvouřetězcového zlomu DNA (DSB, *Double-Strand Break*). Prvním opravným mechanismem je NHEJ (*Non-Homologous End Joining*, *spojení nehomologních konců DNA*) a druhým mechanismem je HR (*Homology Recombination*, *homologní rekombinace*) ([shrnutí v Zhivotovsky et Kroemer, 2004](#)). Sesterské chromatidy mohou být kovalentně spojeny, nesprávně segregovány, a jedno- i dvouřetězcové zlomy jsou náchylnější k rozsáhlým přestavbám. Důsledkem jsou další chromozomální zlomy nebo fúze vedoucí v delece či translokace, HRSs (*Homogenously Staining Regions*, *homogenně značené regiony*) nebo mohou vést ke vzniku acentrických chromozomů („double minutes“). Tyto mutace ústí v případě transformace buněk v aberantní mitózy a ztráty celých chromozomů nebo v případě neudržitelného stavu poškození v mitotické katastrofy a apoptózy ([shrnutí v Lengauer et al., 1998](#)).

2.1.1.2.2 Numerická nestabilita chromozomů

Numerická nestabilita chromozomů byla nalezena u velké většiny typů nádorů. Vzniká aberantní polyploidizací (aneuploidie s monosomií, trisomií a vyšší polysomií), která je důsledkem fúze dceřiných jader, endomitózy nebo endoreduplikace ([Duesberg et al., 2000](#)). Také může pramenit z mutace v proteinech APCC (*Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*, *anafázního promočního komplexu/cyklozómu*) ([Eytan et al., 2006](#)) a nesprávné duplikace centrozómu, což způsobuje multipolární mitózy jako důsledek přemíry exprese cyklinu E, mutací genů pro BRCA1 a BRCA2 (*Breast Carcinoma 1 a 2, gen hereditárního karcinomu rakoviny prsu*), amplifikací kinázy AuroraA nebo inaktivací

nádorového supresoru p53. Další možností je chybná kontrola mitotického vřeténka, která však obvykle končí apoptózou (shrnutí v Lengauer *et al.*, 1998).



Obrázek 2-2: Schéma vzniku nestability genomu na úrovni chromozomů.

2.2 Poškození DNA

Buňky lidského těla jsou pod konstantním působením cytotoxických a mutagenních látek, které poškozuji DNA (Kastan *et Bartek*, 2004). Chromozomy jsou křehké a mají schopnost akumulace mutací v čase (Sinclair *et Oberdoerffer*, 2009).

Faktory, už nichž bylo dokázáno, že poškozuji DNA, se podle své povahy řadí do tří skupin na fyzikální, chemické a biologické. Fyzikální faktory zahrnují ionizující rentgenové záření, neionizující UV záření, působení elektromagnetického pole a přítomnost azbestových vláken v buňkách či lokální tepelné změny. Tyto faktory vyvolávají zlomy DNA přímo nebo nepřímo skrze ROS (*Reactive Oxygen Species*, reaktivní kyslíkové radikály) produkované fotolýzou molekul vody (Lee *et Wei*, 2007).

Chemické faktory se dělí na exogenní a endogenní. Příkladem exogenních látek jsou aromatické a polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy a azosloučeniny, nitrosločeniny, chemoterapeutika (viz 2.3.2.4), přírodní toxiny i anorganické ionty. Tyto látky chemicky modifikují báze, štěpí vazby v DNA, blokují replikační aparát interakcí s jeho proteiny nebo tvorbou aduktů na DNA. Při odstranění těchto účinků dochází ke vzniku zlomů DNA. Mezi endogenní chemické karcinogeny se řadí steroidní hormony (Hahn *et al.*, 1999).

Do skupiny biologických faktorů náleží onkoviry (např. HIV, HTLV, HPV), bakterie (např. *Helicobacter pylori*) a paraziti (např. *Schistosoma*). Tyto faktory indukují chronické záněty, stimulují buněčné dělení, vyvolávají tvorbu ROS a indukují mutagenní přeskoky transpozonů.

Všechny uvedené skupiny agens poškozují DNA různými způsoby. Některé vyvolávají vlastní metabolickou přeměnou ještě další poškození DNA. Vnitrobuněčně dochází k poškození DNA metabolickými procesy, které generují ROS (např. dýchací řetězec nebo peroxidace lipidů), spontánním kolapsem replikačních vidliček nebo programovaným sestřihem DNA během meiotické rekombinace či konverze genů pro imunoglobuliny (Link *et al.* Schroeder, 2002).

Všechny organismy v evoluci vyvinuly enzymové reparační systémy pro opravu DNA, které brání mutacím. Tyto systémy se třídí podle mechanismu oprav na přímé jednokrokové opravy a nepřímé opravy. Savčí nepřímé mechanismy oprav poškozené DNA jsou: NER (*Nucleotide Excision Repair*, nukleotidová excizní oprava), BER a MMR (viz 2.1.1.1), HR a NHEJ pro opravu DSB (viz 2.1.1.2.1) (Burma *et al.*, 2006). Existuje také mechanismus obcházení poškozených míst translezní replikací DNA (Lehman A.R., 2006).

Poškození DNA, které vyvolává rakovinu, je také používáno k její léčbě (viz 2.3.2.4) a je zodpovědné za toxicitu spojenou s touto léčbou (např. suprese kostní dřeně, záněty tlustého střeva, ztráta vlasů) (Kastan *et al.* Bartek, 2004). Dosud není jasné, proč jsou na chemoterapeutika poškozující DNA citlivé více rakovinné buňky než normální replikující buňky (Vogelstein *et al.* Kinzler, 2004).

2.2.1 Buněčná odpověď na poškození DNA

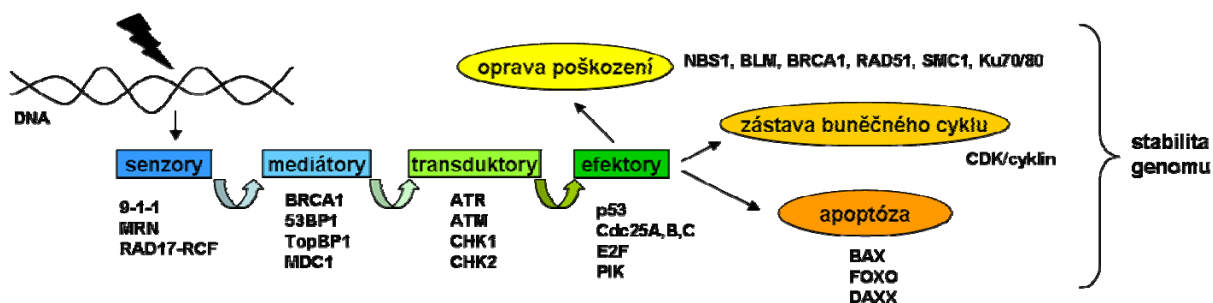
Udržení integrity genomu je esenciální pro homeostázu a přežití buněk. Podle deficitu v mechanismech oprav, vzniklém z mutací genetických a epigenetických faktorů, dochází ke vzniku patologických stavů, které ústí v neurodegenerativní choroby, syndromy imunodeficience, předčasné stárnutí a rakovinu (Mistrik *et al.*, 2009).

Poškození DNA blokuje transkripci a replikaci, zastavuje buněčný cyklus, iniciuje opravy a popř. indukuje apoptózu. Pokud buňky chybně opraví poškození, dojde k fixaci první mutace (tolerance poškození DNA), což vede k akumulaci dalších mutací a nádorové transformaci (viz obr. 2-1 výše) (Bartková *et al.*, 2004).

Buňky po vzniku poškození DNA iniciují složitou signální síť nazývanou odpověď na DNA poškození DDR (*DNA Damage Response*) (shrnutí v Bartek *et al.*, 2007). Ačkoliv

vznikají různé typy poškození DNA, které aktivují různé mechanismy oprav, vždy dochází ke koordinaci zástavy buněčného cyklu s opravami DNA a aktivací proapoptotických drah (Shiloh Y., 2004). Nejzávažnějším druhem poškození DNA jsou DSB, ale nejčastějším poškozením, je chybná inkorporace báze při replikaci DNA (Liu *et al.*, 2006).

Kaskády proteinů, uplatňujících se v DDR, zahrnují senzorké molekuly, které monitorují integritu genomu v každém okamžiku interfáze buněčného cyklu. V případě výskytu poškození DNA pomáhají generovat signál, který je amplifikován adaptory/mediátory a signálními transduktory. Tyto komponenty DDR předávají signál na efekty spojené s expresí proteinů, které ovlivňují kontrolní body buněčného cyklu (viz obr. 2-3). Všechny proteiny uplatňující se při DDR lze rozdělit do čtyř kategorií, v nichž některé proteiny nemají jednoznačnou funkci (Lukas *et al.*, 2004; McGowan *et Russell*, 2004).



Obrázek 2-3: Konceptuální organizace signální transdukce po poškození DNA.

2.2.1.1 Senzory poškození DNA

První skupina zahrnuje senzory poškození DNA, jejichž evoluční konzervovanost k člověku byla zjištěna již od kvasinek (Paulovich *et al.*, 1998). Patří k nim heterotetramerní komplex PCNA-9-1-1 (složený z proteinů *Proliferative Cell Nuclear Antigen*, *proliferací buněčný jaderný antigen*; *Rad9-Rad1-Hus1*, *RAD*iation *senzitivní mutant 9 a 1*, *mutant citlivý na záření 9 a 1*; *Hus1*) (Lukas *et al.*, 2004). Dalším senzorem je dimer Rad17-RFC (*Replication Factor C*, *replikační faktor C*), který ovlivňuje vazbu 9-1-1 komplexu do místa poškození DNA (Griffith *et al.*, 2002; Zou *et Edledge*, 2002). Posledním popsaným senzorem je komplex MRN složený z nukleáz Mre11-Rad51-NBS1 (*Mitotic REcombination protein 11*, *protein 11 mitotické rekombinace*; *Rad51*, *Nijmegen Breakage Syndrom 1*) (Goldberg *et al.*, 2003). Komplex MRN předává signál na kinázu ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), a komplexy 9-1-1 a Rad17-RFC na kinázu ATR (*Ataxia Telangiectasia mutated and Rad-3-related*) (viz dále 2.2.1.3.1 a 2.2.1.3.2) (Sörrensen *et al.*, 2004).

2.2.1.2 Mediátory poškození DNA

Druhá skupina je složena z mediátorů, které jsou rekrutovány senzory do míst poškození DNA a signál předávají formou aktivace transduktorů. Přesné pořadí a vazby mezi jednotlivými proteiny jsou známy jen částečně. Mediátory zahrnují proteiny, které obsahují doménu BRCT (*BRCA1 C-Terminus repeat domain, doména opakujícího se C-konce proteinu rakoviny prsu*), jež umožňuje specifické protein-fosfoproteinové interakce (Yu *et al.*, 2003). Do skupiny patří proteiny 53BP1 (*p53 Binding Protein 1, vazebný protein p53*) (Schulz *et al.*, 2000), MDC1 (*Mediator of DNA Damage Checkpoint 1, mediátor kontrolního bodu poškozené DNA 1*), TopBP1 (*Topoisomerase II β -Binding Protein 1, vazebný protein topoizomerázy II β*) (Yamane *et al.*, 2003), BRCA1 (Lou *et al.*, 2005) a Claspin (Liu *et al.*, 2006).

2.2.1.3 Transduktory poškození DNA

Třetí skupina je tvořena apikálními kinázami s funkcí signálních transduktorů, které patří do rodiny PI3-K (*Phosphatidylinositol-3-Kinase, fosfatidylinositol-3-kináza*). Hlavními představiteli jsou již zmíněné ATM a ATR kinázy (viz 2.2.1.1). To jsou velké proteiny (okolo 300 kDa), které postrádají lipidickou aktivitu charakteristickou pro tuto rodinu (shrnuto v Abraham R.T., 2004). Dalším členem rodiny je DNA-PK (*DNA-Protein-Kinase, DNA proteinová kináza*), která reguluje následné opravné mechanismy. K rodině patří také protein mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin, savčí protein odpovídající na rapamycin*), který regulací translace koordinuje syntézu proteinů buněčného růstu a proliferace (shrnuto v Kaur *et al.*, 2007). Dosud neznámou funkci v reakci na poškození DNA má nový člen PI3-K rodiny, kináza SMG-1 (nebo také ATX) (Abraham R.T., 2004).

ATM je primárně aktivována po vzniku DSB a ATR je indukována v odpovědi na rozpad komplexů replikačních vidliček a jednovláknové konce odhalené při vzniku DSB (Kastan *et Bartek*, 2004; Yoo *et al.*, 2009). ATM se vyskytuje v neaktivním stavu jako homodimer. Pro aktivaci po vzniku DSB je nezbytná konformační změna molekuly, která umožňuje autofosforylaci na S1981, vedoucí k disociaci homodimerů od sebe (Bakkenist *et Kastan*, 2003). Konkrétní mechanismus této aktivace dosud nebyl objeven, ale předpokládá se, že jistou roli by mohla hrát i acetylace ATM na K3016 (Sun *et al.*, 2007) a také fosforylace na jiných místech molekuly (Kim *et al.*, 2009). Aktivace ATR probíhá před aktivací senzorických komplexů uvedených v 2.2.1.1. (Forey *et al.*, 2003).

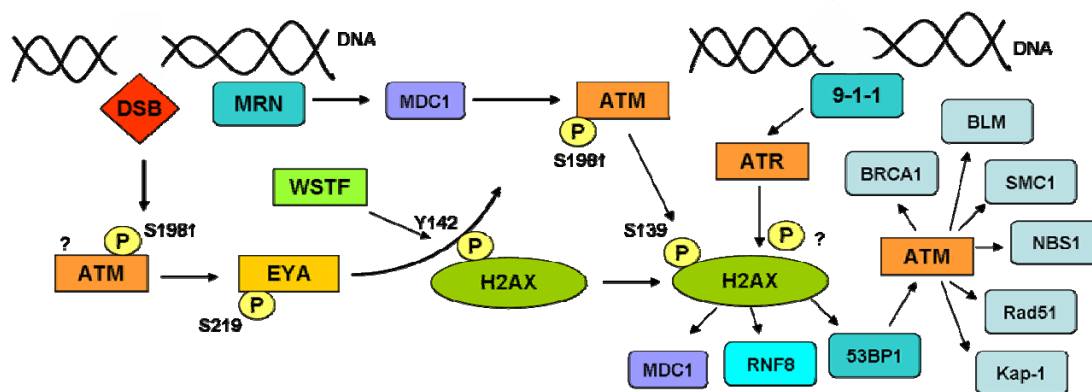
2.2.1.3.1 *Ataxia telangiectasia mutated*

Signalizace od monomerní ATM míří na substráty, které regulují zástavu buněčného cyklu indukci inhibitorů kontrolních bodů cyklu. Jedna větev aktivuje také opravné mechanismy. Tato část vede přes fosforylaci fosfatázy EYA (*EYes Absent, gen mutanty bez očí*) na S219, která umožňuje rekrutaci γ H2AX do místa poškození DNA (Cook *et al.*, 2009).

2.2.1.3.1.1 γ H2AX

Savčí buňky mají přes 10% histonu H2A zastoupeno variantní formou H2A.X (Rogakou *et al.*, 1999). Oproti ostatním H2A má tato varianta unikátní místo pro fosforylaci na svém C-konci. H2A.X je fyziologicky fosforylován na Y142 tyrozin kinázou WSTF (*Williams-Beuren Syndrome Transcription Factor, transkripční faktor syndromu Williams-Beuren*), která je komponentou komplexu WICH (*WSTF-ISWI ATP-dependent CHromatin-remodelling complex, nebo také BAZ1B*) (Xiao *et al.*, 2009). Po vzniku DSB je tato fosforylace na Y142 odstraněna fosfatázou EYA (Cook *et al.*, 2009), která H2A.X tímto aktivuje. Pro plnou aktivaci je nutná fosforylace na S139 skrze kinázu ATM (γ H2AX) aktivovanou vznikem DSB (Cowell *et al.*, 2007) (viz obr. 2-4). Tato fosforylace je příčinou dekonenzace chromatinu fosforylací N-konců histonů, která otevírá prostor pro tvorbu mikroprostředí k zahájení opravných mechanismů (Kruhlák *et al.*, 2006). Do místa poškození jsou rekrutovány proteiny oprav DNA (Rogakou *et al.*, 1998), vytvářejí mikroskopicky viditelné fokusy, které se při dlouhodobé lokalizaci nazývají PDDF (*Persistent DNA Damage Foci, perzistentní fokusy poškození DNA*) (Rodier *et al.*, 2009).

Od místa léze chromozomu je dvoušroubovice v obou směrech rozplétána v délce až několika Mbp za řetězovité aktivace γ H2AX, MDC1 a 53BP1 (Rogakou *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2003). Aktivní 53BP1 zpětně aktivuje ATM (DiTullio *et al.*, 2002). ATM je fosforylována na 31 místech, má potenciálně přes 700 substrátů (Matusoka *et al.*, 2007) a mimo jiné fosforyluje proteiny účastnící se homologní rekombinace: NBS1 (S343, S397 a S615) (Lim *et al.*, 2000), helikázu BLM (*helicase BLoom syndrom*, T99 a T122) (Rao *et al.*, 2007), BRCA1 (S1387, S1423 a S1524) (Cortez *et al.*, 1999), Rad51 (T54 a T135) (Lord *et al.*, 2007) a SMC1 (*Structural Maintenance of Chromosomes I*) (viz obr. 2-4) (Goldberg *et al.*, 2003). ATM řídí také globální dekonenzaci chromatinu skrze fosforylaci proteinu Kap-1 (*KRAB domain-Associated Protein-1, protein 1 spojený s doménou KRAB*) (Kim *et al.*, 2009).



Obrázek 2-4: Schéma aktivace H2AX (převzato z Cook *et al.*, 2009 a upraveno podle Xiao *et al.*, 2009).

ATM ovlivňuje buněčný cyklus skrze fosforylaci CHK2 (*CHeckpoint K*inase *2*, kináza 2 kontrolního bodu) na T68 (Canman *et al.*, 1998). Tato aktivace je následně podpořena dalšími fosforylacemi v pozitivní zpětnovazební smyčce pro plnou aktivaci (Rao *et al.*, 2007) a konvergenci signálu na inhibičně-pomalejší dráhu s p53 (Canman *et al.*, 1998) a/nebo inhibičně-rychlejší dráhu s fosfatázou Cdc25A (*C*ell *d*ivision *c*ycle *25A*) (Lukas *et al.*, 2004). Regulátorem aktivity ATM je histonová acetyltransferáza Tip60 (*T*at-*I*nteracting *P*rotein 60, protein 60 interagující s Tat) (Sun *et al.*, 2007), fosfatázy PP1 (*P*rotein *P*hosphatase *1*, proteinová fosfatáza 1) a Wip-1 (*W*ild-type *p*53-*I*nduced *P*hosphatase *1*, fosfatáza indukovaná nemutovaným p53) (Lu *et al.*, 2007).

ATM není pro buněčný cyklus ani diferenciaci esenciální a buňky bez této kinázy jsou viabilní. Germinální mutace v genu pro ATM kinázu vede k vývinu vzácného autozomálně recesivního onemocnění Ataxia telangiectasia. Mutace v genu pro CHK2 byla nalezena u pacientů s Li-Fraumeniho syndromem (Uziel *et al.*, 2003).

Substrátem pro CHK2 jsou mimo jiné Cdc25A, Cdc25C, BRCA1 a p53. CHK2 je zodpovědná za aktivaci proapoptotické dráhy skrze p53, ale ne za G2/M zástavu buněčného cyklu po poškození DNA. ATM a CHK2 mají hlavní funkci v intra-S fázním kontrolním bodu (viz 2.4.2), který po poškození DNA indukuje zástavu cyklu v S-fázi (Bartek *et al.*, 2004).

2.2.1.3.2 Ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related

ATR byla původně objevena podle sekvenční homologie k ATM. Oproti ATM je ATR v buněčném cyklu nenahraditelná, protože je během S-fáze aktivována prakticky neustále přítomností SSB při replikaci a indukuje opravné mechanismy. Deficit ATR u člověka vyvolává vzácné autozomálně recesivní dědičné onemocnění Seckelův syndrom (O'Driscoll *et al.*, 2003).

ATR je aktivována také v odpovědi na UV záření, některá chemoterapeutika a nekorektní replikaci DNA, které vyvolávají SSB. Poškození je monitorováno kromě již zmíněného PCNA-9-1-1 komplexu (Griffith *et al.*, 2002) (viz 2.2.1.1.) i proteinem RP-A (*Replicative Protein A*, replikační protein A). Na RP-A se váže ATR v komplexu s ATRIP (*ATR-Interacting Protein*, protein interagující s ATR) po vzniku poškození DNA. ATR aktivovaná pomocí 9-1-1 předává signál dále na CHK1 (*Checkpoint Kinase 1*, kináza 1 kontrolního bodu) (Sörrensen *et al.*, 2004). ATR aktivovaná skrze RP-A fosforyluje γ H2AX (Forey *et al.*, 2003).

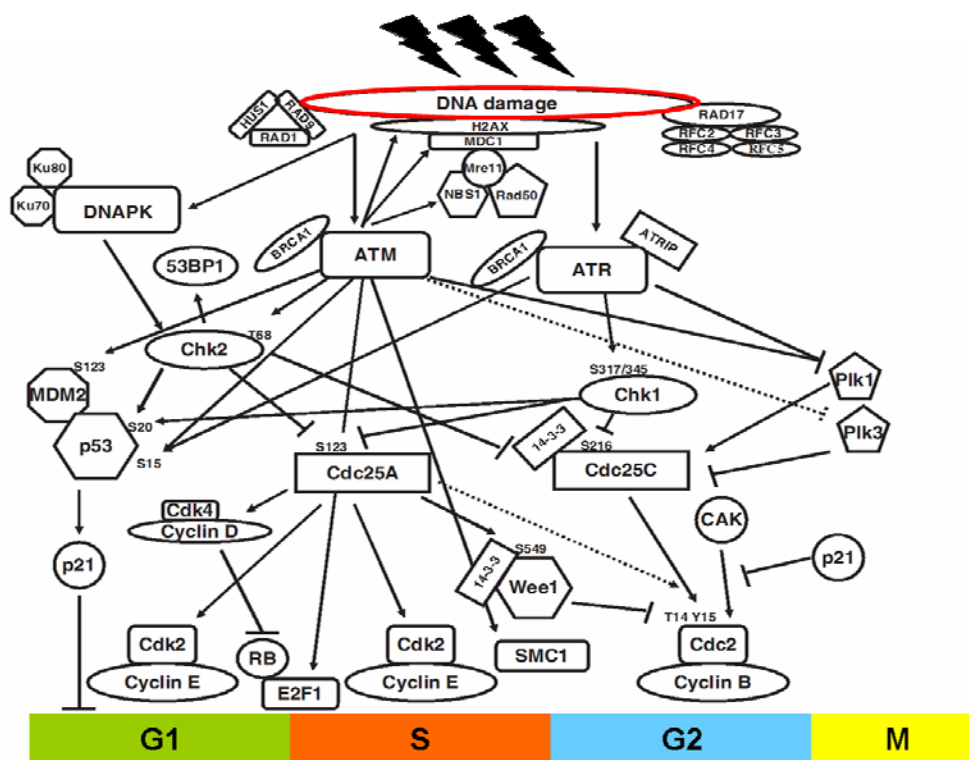
Aktivní CHK1 (S317, S345) inhibuje aktivitu fosfatázy Cdc25C nezbytnou pro přechod z S-fáze do G2-fáze (Bartek *et al.*, 2003), a také aktivuje WEE1 kinázu, která je známým inhibitorem CDK (Touny *et al.*, 2006). Pro uvolnění zástavy cyklu a postup buněk do mitózy musí dojít k úspěšné opravě všech lézí na DNA a k deaktivaci CHK1. Tuto deaktivaci zajišťují fosfatázy rodiny PP1 (*Protein Phosphatase 1*, proteinová fosfatáza 1), které ji defosforylují (shrnuto v Tapia-Aveal *et al.*, 2009). Existuje ještě další způsob aktivace CHK1 a to díky proteinu Claspín (viz 2.2.1.2), který indukuje Cdc25A. Snížení exprese proteinu Claspín vede ke snížení aktivace CHK1 dokonce i při poškození DNA (Chini *et al.*, 2006). Bylo dokázáno, že buňky nejsou schopny zastavit buněčný cyklus v S-fázi v přítomnosti poškození DNA, pouze pokud jsou inhibovány všechny kinázy ATM, ATR, CHK1 a CHK2 najednou (di Fagagna *et al.*, 2004). Deplece CHK1 vede k indukci chromozomální nestability a zlomům fragilních míst chromozomů (Durkin *et al.*, 2006).

ATM-CHK2 a ATR-CHK1 jsou dvě dráhy oznamující poškození DNA. Nejsou to dvě větve odlišné signalizace, ale tvoří dobře propojenou koordinovanou síť (viz obr. 2-5) (Gatei *et al.*, 2003). Komplex ATM-CHK2 hraje důležitou úlohu také v indukci quiescence u terminálně diferencovaných buněk (Lukas *et al.*, 2004).

2.2.1.4 Efektory poškození DNA

A konečně poslední skupina proteinů účastnících se DDR kloubí různé efektory kontrolních bodů jako jsou již zmíněné fosfatázy Cdc25, proteiny oprav DNA, transkripční faktory p53 či E2F (*Eukaryotic transcription Factor 2*, eukaryotický transkripční faktor 2) (Dimri *et al.*, 1996) a Plk (*Polo-like kinase*, kináza podobná Polo). Rodina Cdc25 zahrnuje tři fosfotyrozinové fosfatázy (A,B,C), které mají schopnost defosforylovat CDK a regulovat progres buněčného cyklu. Tyto fosfázy jsou fosforylovány CHK1 a/nebo CHK2 (viz 2.2.1.2. a 2.2.1.3), což vede k vazbě proteinu 14-3-3, který reguluje jejich aktivitu

skrze řízenou přímou inhibici, přesun z jádra do cytoplazmy nebo iniciaci proteolytické degradace (Telles *et al.*, 2009).



Obrázek 2-5: Schéma signálních drah účastnících se DDR (převzato a upraveno podle Niida *et Nakanishi*, 2006).

2.2.1.4.1 Nádorový supresor p53

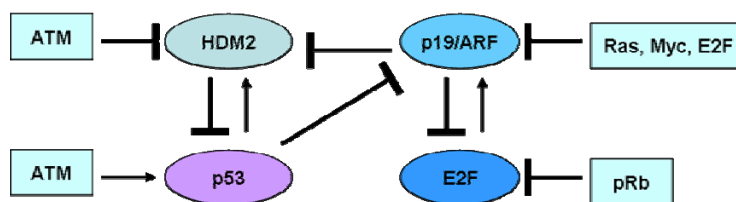
Fosfoprotein p53 hraje centrální roli v rozhodnutí buňky o zástavě buněčného cyklu, inhibici angiogeneze, opravách DNA a indukci apoptózy na základě stimulů DNA poškození, hypoxie, deplece nukleotidů nebo aberantní aktivace onkogenů (Zhang *et al.*, 2005b). Funkční p53 je homotetramer složený z transaktivační, DNA vazebné, oligomerizační a regulační domény. Za fyziologických podmínek je v buňce exprimován konstitutivně, i když je jeho hladina velmi nízká díky zpětnovazebné autoregulační smyčce. Množství p53 je regulováno degradačně skrze ubiquitin-ligázy (ubiquitynlace).

Transkripční aktivita p53 je regulována post-translačními modifikacemi (Canman *et al.*, 1998) v odpovědi na proteinové kinázy (fosforylace na S6, 9, 15, 20, 33, 37, 392), histon acetylázy (acetylace na K320, 373, 382 skrze CBP/p300; *cAMP Enhancer Binding protein (CREB)-Binding Protein*, protein vázající CREB) (Fogal *et al.*, 2000), metyltransferázy (metylace), SUMO-ligázy (SUMOylace) (Müller *et al.*, 2004) a neddylace. Negativní regulace aktivity p53 zahrnuje interakce s fosfatázami (defosforylace na S376), histon-deacetylázami (deacetylace) a ubiquitinázami (deubiquitynlace) (shruto

v Harris *et al.*, 2005). Bylo zjištěno, že až v 50% všech typů nádorů je p53 mutován (Gorgoulis *et al.*, 2005) a ve zbytku typů jsou narušené p53-dependentní procesy, které regulují jeho aktivitu.

V normální buňce je hladina p53 ovlivněna vazbou k ubiquitin-ligáze HDM2 (*Human Double Minute 2, myší homolog MDM2*) (Kubbutat *et al.*, 1997), která je exprimována současně s p53 a zprostředkovává rychlý export p53 do cytoplazmy skrze „zamaskování“ jeho transkripční domény a následně proteazomovou degradaci (Ressler *et al.*, 2006). U rostlin je tímto regulátorem Cop-1 (*CO*nstitutively *P*hotomorphogenic *L*, *protein reprimující morfogenezi konstitutivně*) (Dornan *et al.*, 2004). Časně při vzniku poškození DNA kinázy ATM a ATR fosforylují p53 přímo (S15) nebo nepřímo skze CHK2 (S20), čímž inhibují interakci p53 s HDM2 vedoucí ke stabilizaci p53 v cytoplazmě (Zhang *et al.*, 2005b). ATM zvyšuje tuto stabilizaci navíc fosforylací HDM2 (S123) (Kubbutat *et al.*, 1997) (viz obr. 2-6). p53 může být aktivován také p38-MAPK (S33 a S46) v odpovědi na aberantní aktivaci onkogenů (Lu *et al.*, 2007).

Klíčovým transkripčním cílem p53 je p21^{WAF/CIP/SDI1} (dále jen p21), který inhibuje aktivitu komplexu cycE-CDK2 (*cyclinE-Cyclin Dependent Kinase 2, cyklinE-cyklin dependentní kináza 2*) (viz 2.4) a tím brání buňce v zahájení replikace DNA. Mezi další p53-depedentní proteiny patří např. PCNA, protein 14-3-3 inhibující Cdc25 fosfatázy, p48, proapoptotické PUMA, NOXA, BAX, FASR, nebo trombospondin inhibující angiogenezi (Harris *et al.*, 2005). Později po poškození DNA dochází k poklesu exprese p53 skrze snížení koaktivátorů p53 (např. CBP/p300), což mění poměr p53 vůči HDM2 a spolu s a defosforylací HDM2 obnovuje autoregulační smyčku (Lu *et al.*, 2007).



Obrázek 2-6: Schéma signalizace ovlivňující stabilizaci p53 (převzato a upraveno Harris *et al.*, 2005).

Buňky v odpovědi na poškození DNA vyvinuly kromě apoptózy a oprav DNA další mechanismus, který také ochraňuje organismus před zhoubným bujením nereparovatelně poškozených buněk, jež však nejsou poškozené natolik, aby aktivovaly apoptózu, anebo ztratily schopnost apoptózou odpovědět (von Zglinicky *et al.*, 2005). Tímto mechanismem je buněčná senescence.

2.3 Buněčná senescence

Buněčná senescence je specializovaná forma terminální diferenciací známá půl století. Je to programovaná irreverzibilní zástava buněčného cyklu, která je od roku 1991 považována za prostředek, vyvinutý v ochraně organismu proti nádorovému růstu paralelně k apoptóze (Sager R., 1991). V současné době je tato hypotéza, že senescence limituje nadměrnou nebo abnormální proliferaci buněk vystavených různým endogenním či exogenním poškozujícím vlivům, obecně uznávanou skutečností (Bartková *et al.*, 2006; Collado *et al.*, 2007; Di Micco *et al.*, 2006; von Zglinicky *et al.*, 2005).

Bylo popsáno několik případů existence senescentních buněk také *in vivo* v tkáních se sebeobnovnou schopností, např. endotelová tkáň cévního systému, kostní dřeň, epitelová tkáň (Campisi *et di* Fagagna, 2007), a konkrétně byly nalezeny senescentní melanocyty pigmentových névů (Michaloglou *et al.*, 2005). Senescence je fenomén spojený se stárnutím normálních buněk kultivovaných *in vitro* a stárnutím celého organismu (de Lange, T., 2002). Vztah mezi těmito jevy je možné vysvětlit kryptickou akumulací poškození DNA, které je nereparovatelné (Sedelníková *et al.*, 2004). Senescentní buňky objevené *in vivo* přispívají k procesu stárnutí svou akumulací ve tkáni a také limitací sebeobnovného potenciálu kmenových buněk („loss of stem cell pool“) (Collado *et al.*, 2007). V současné době existují dva typy buněčné senescence: replikační a předčasná buněčná senescence.

2.3.1 Replikační buněčná senescence

Před více jak 40 lety byla objevena specifická zástava proliferace normálních lidských buněk po dlouhodobé kultivaci *in vitro* (Hayflick *et Moorhead*, 1961). Později bylo zjištěno, že je délka života buněk omezena (tzv. Hayflickův limit). Tato skutečnost je v současné době zpochybňována, protože u kmenových buněk není limit určen a u myších buněk dochází po zhruba deseti děleních k imortalizaci. Proliferační potenciál je definován integritou a délkou telomer a u kmenových nebo progenitorových buněk expresí telomerázy (Harley *et al.*, 1990).

Současná hypotéza délky telomer vysvětluje replikační senescenci jako důsledek zkrácení telomer. Telomery jsou tandemová zakončení lineárních chromozomů, která se při každé replikaci zkracují díky neschopnosti standardní DNA polymerázy plně dosyntetizovat opoždující se vlákno DNA (Olovnikov A. M., 1973). Telomeráza je ribonukleoproteinový enzym, který katalyzuje jejich *de novo* syntézu a tím udržování. Normální buňky tento enzym exprimují na velmi nízké hladině, proto dochází ke

zkracování telomer (shrnutí v Sharpless *et al.*, 2004). Za určitý počet dělení, který je závislý na druhu buňky i organismu (od kvasinek přes rostliny k živočichům), dojde ke kritickému zkrácení až na kritickou úroveň s euchromatinem a buňka nechráněné konce chromozomů rozpoznává jako poškození DNA ve formě DSB (di Fagagna *et al.*, 2003). Toto poškození DNA je příčinou zástavy buněčného cyklu, které *in vivo* vede k indukci apoptózy, a v případě buněk kultivovaných *in vitro* k indukci fenoménu, který byl nazván replikační senescencí („replicative cellular senescence“) (shrnutí v Gewirtz *et al.*, 2008).

Díky biochemickým experimentům dokazujícím nestabilitu telomer bylo zjištěno, že transformované buňky získávají neomezený proliferační potenciál reaktivací telomerázy a méně často aktivací alternativního mechanismu prodlužování telomer (Sharpless *et al.*, 2004).

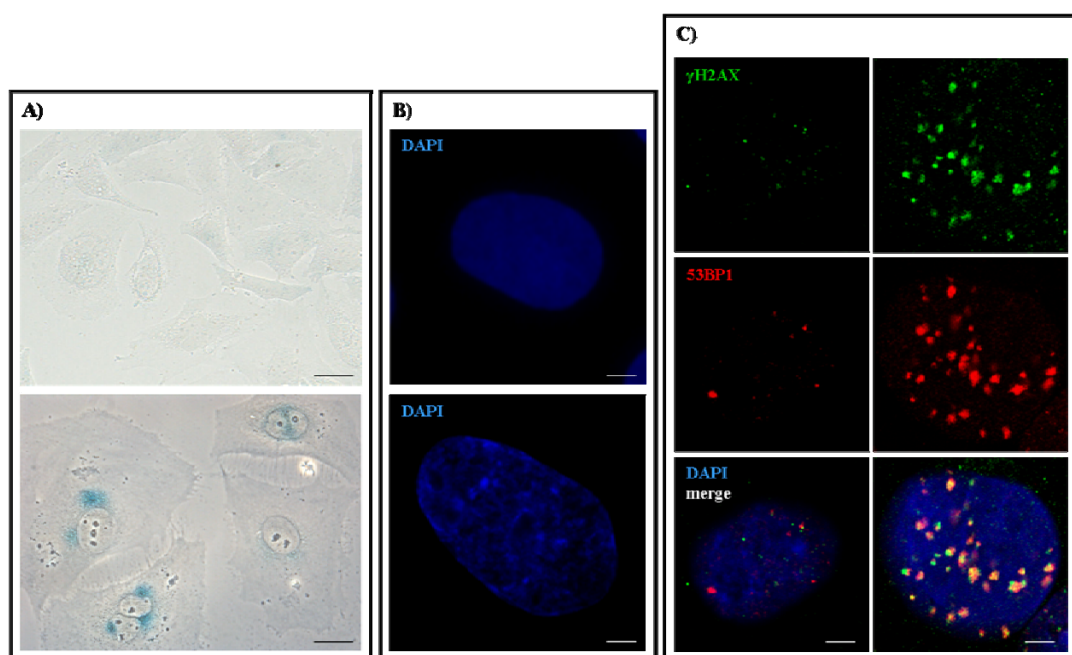
2.3.2 Předčasná buněčná senescence

Před dvěma desetiletími popsali W.O'Brien a R. Sager objev trvalé zástavy proliferace u lidských fibroblastů v odpovědi na virovou infekci a nezávisle na proliferačním potenciálu (O'Brien *et al.*, 1987). V roce 1991 bylo také zjištěno, že se primární myší fibroblasty přestávají dělit a mění svou morfologii pod působením etanolu nebo tert-butyldihydroperoxidu (Toussaint *et al.*, 1991). Buňky akumulují proteiny p53 a p16^{INK4A} (dále jen p16) a fenotypicky se neodlišují od buněk, které podstupují replikační senescenci. Tento nově objevený fenomén, který není závislý na délce telomer, byl nazván stresem indukovanou předčasnou senescencí („stress-induced premature cellular senescence“). Tento název byl později po objevech podobných typů senescence podřazen pod pojem předčasná senescence (*Premature cellular Senescence* nebo „accelerated cellular senescence“, dále jen PS) (Serrano *et al.*, 1997).

Existence PS byla od té doby dokázána také u mnoha druhů lidských buněk (Zhu *et al.*, 1998). PS může být vyvolána *in vitro* a *in vivo* pleiotropní skupinou stimulů, které představují buněčný stres. Fyziologický stres působící na buňky má kumulativní charakter a vnější stres může vyvolat další vnitřní stres. Příkladem, kromě zmíněné aberantní aktivity onkogenů a oxidačního stresu, je také působení látek poškozujících DNA, neadekvátní růstové podmínky nebo změna ve struktuře chromatinu (Campisi *et al.*, 2007).

2.3.2.1 Společná charakteristika

Buňky podstupující replikační nebo předčasnou senescenci jsou viabilní a zůstávají metabolicky aktivní *in vitro* po mnoho měsíců až 4 roky. Bylo zjištěno, že se od replikačně-kompetentních buněk odlišují v mnoha fenotypických parametrech (Dimri G.P., 2005). Senescentní buňky mají změněnou morfologii (velikost, viz obr. 2-7A) (Bemiller *et al.*, 1978) a biochemické či fyziologické vlastnosti jako je zvýšená adherence (Hayflick *et al.*, 1977) a heterochromatinizace umlčující transkripci (SAHF, *Senescence-Associated Heterochromatin Foci*) prezentovaná „DAPI foci“ (viz obr. 2-7B) (Narita *et al.*, 2003), dále delecí mitochondriální DNA (Dierick *et al.*, 2002), zvýšením inhibitorů buněčného cyklu (např. p53, p21, pRb, p16) (Serrano *et al.*, 1997), snížením c-Fos (Bringold *et al.*, 2000), zvýšením počtu autofagických vakuol lysozomálního kompartmentu se zvýšenou expresí enzymu SA- β -Gal (*Senescence-Associated β -Gal, se senescencíspojenou β -galaktosidázou*) prezentovanou modrým zbarvením v cytolazmě buněk (viz obr. 2-7A) (Dimri *et al.*, 1995), délkou telomer (di Fagagna *et al.*, 2003), perzistentní DDR (PDDF, viz obr. 2-7C a 2.2.1.3.1.1) (Rodier *et al.*, 2009) a hladinou produkovaných ROS (Duan *et al.*, 2005). Ze studie porovnávající proteomy obou druhů buněčných senescencí vyšlo najevo, že nejsou zcela identické v souboru exprimovaných proteinů (Dierick *et al.*, 2002).



Obrázek 2-7: Příklady morfologických a biochemických změn senescentních buněk. A) exprese SA- β -Gal (měřítko 5 μ m) (převzato a upraveno od Dr.Hany Hanzlíkové), B) SAHF (měřítko 0,5 μ m), C) PDDF (měřítko 0,5 μ m) (převzato a upraveno od Soni Hubáčkové).

Senescentní buňky nejsou schopny exprese genů pozitivně regulujících proliferaci dokonce ani v případě suprafyziologických mitogenních stimulů. To je odlišuje od

quiescentních buněk, které se po přijetí mezibuněčného signálu vrátí zpátky do cyklu (shrnutí v tab. 2-1) (Narita *et al.*, 2003). Od terminálně diferencovaných buněk se senescentní buňky odlišují specifickou histochemickou detekcí SA- β -Gal (Dimri *et al.*, 1995).

Tabulka 2-1: Charakteristiky buněčné senescence.

Vlastnosti	Quiescence	Replikační senescence	Stresem indukovaná předčasná senescence
Stabilita	reverzibilní	permanentní	permanentní
Indukce	nedostatek živných látek, růst ve vysoké denzitě, transientní poškození DNA	zkrácení telomer, permanentí poškození DNA	oxidační stres, aberrantní aktivace onkogenů, genotoxické látky, permanentí poškození DNA
Morfologické změny	beze změn	zvětšený objem a plocha buněk, zvětšené jádro, přítomnost stresových granul v cytoplazmě SAHF	zvětšený objem a plocha buněk, zvětšené jádro, přítomnost stresových granul v cytoplazmě SAHF
Změny chromatinu	beze změn	methylace histonu 3 na K9 vazba HP1 PDDF	methylace histonu 3 na K9 vazba HP1 PDDF
Biochemické změny	beze změn	SA- β -gal	SA- β -gal
Změna exprese	exprese c-FOS sérem inducibilní, nízká exprese PAI	exprese c-FOS sérem neinducibilní, vysoká exprese PAI	exprese c-FOS sérem neinducibilní, vysoká exprese PAI
Inhibitory b. cyklu	p53, p21, p27, pRb	p53, p21, p16/ARF, pRb	p53, p21, p16/ARF, pRb

V současné době je na oba typy senescence nahlíženo jako na mechanismy paralelní, které se mohou vyskytnout v každé buňce bez ohledu na proliferační potenciál. Buňky, jež jsou nejrezistentnější k poškození DNA, jsou nakonec zastaveny přirozeným poškozením telomerické DNA. Buňky méně rezistentní přecházejí do PS po poškození na jiných místech genomu (Campisi *et di* Fagagna., 2007).

PS je dělena podle mechanismu indukce na tři podtypy: oxidačním stresem indukovaná senescence, onkogeny indukovaná senescence a chemicky indukovaná senescence. Postupem doby se však ukazuje toto rozdělení jako příliš jednoduché, protože např. onkogeny indukovaná senescence je spojena také s poškozením DNA, které je vyvoláno replikačním stresem a ROS (Bartková *et al.*, 2006; Di Micco *et al.*, 2006).

2.3.2.2 Onkogeny-indukovaná předčasná senescence

První indukce trvalé zástavy buněčné proliferace, nezávislé na délce telomer, byla popsána v roce 1987 při infekci normálních lidských buněk virem, který nesl virový onkogen Ras (O'Brien *et al.*, 1987). Protein Ras se řadí k malým GTP-vazebným proteinům, které přenášejí mitogenní signál z membránových receptorů na tyrozinové kinázy. Onkogenní aktivace mitogenních signálních kaskád PTEN (*Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosom TEN*) (viz 2.4.1) nebo p38-MAPK (*p38-Mitogen Activated Protein Kinase, proteinová kináza aktivovaná mitogeny*), kterých je protein Ras součástí (Lin *et al.*, 1998), byla později nalezena u buněk s blokováním buněčným cyklem v pozdní fázi G1, jež vykazovaly vlastnosti buněčné senescence (Serrano *et al.*, 1997). Od té doby bylo popsáno mnoho podobných případů i u jiných druhů organismů, např. u hlodavců (Lowe *et al.*, 2004), a tento typ byl pojmenován jako předčasná senescence indukovaná aberantní aktivací onkogenů (Di Micco *et al.*, 2006).

Dosud byly identifikovány nejméně tři buněčné odpovědi na onkogenní stres: formace heterochromatinových fokusů (SAHF), aktivace opravných mechanismů poškození DNA a negativní zpětná vazba potlačení onkogenních signálních drah (Cichowski *et al.*, 2008). Buněčná odpověď na poškození DNA souvisí s aberantní aktivací onkogenů, která vede k zástavě buněčného cyklu a indukci senescence nebo programované buněčné smrti. Indikátory poškození DNA korelují s indikátory senescence a experimenty na buněčných kulturách naznačují, že onkogeny indukovaná senescence vyžaduje perzistentní aktivaci DDR (shrnutí v Bartek *et al.*, 2007). Na druhou stranu však některé experimenty s těmito onkogeny ukazují, že jejich aberantní aktivace nemá schopnost aktivovat odpověď buňky na poškození DNA. Příkladem je aktivace cyklinu D a současná deaktivace inhibitoru buněčného cyklu p16 (Tort *et al.*, 2006). Ukázkou onkogenů, které patří do kategorie „indukujících senescenci“, jsou cyklin E, Cdc6, p16/ARF (Bartková *et al.*, 2006), H-Ras (Serrano *et al.*, 1997), c-mos, Cdc25A, E2F1, STAT5, c-Myc (Collado *et al.*, 2007; Di Micco *et al.*, 2006) a H-Raf. Studie ukázaly, že tento typ senescence také představuje bariéru karcinogeneze (Bartková *et al.*, 2006).

2.3.2.3 Předčasná buněčná senescence indukovaná oxidačním stresem

Normální lidské diploidní fibroblasty exponované subcytotoxickým koncentracím látek jako jsou peroxid vodíku (Duan *et al.*, 2005) a ethanol (Chen *et al.*, 1995) zastavují proliferaci a vykazují mnoho vlastností předčasné senescence již několik dní po expozici (Pascal *et al.*, 2005). Obě látky jsou zvyšující produkci intrabuněčných ROS, které poškozují

nukleové kyseliny, proteiny a lipidy. To je příčinou abnormálních změn v metabolismu buňky, zejména změn v genové expresi a indukci senescence (shrnutí v Wei *et al.*, 2009). ROS jsou ionty nebo radikály formované v nekompletní jedno-elektronové redukci kyslíku buněčného respiračního řetězce. Bylo zjištěno, že v patofyziologii rakoviny manifestují ROS dvě role: podporují karcinogenezi skrze aktivaci Ras-Raf-Mek1/2-Erk1/2 dráhy a také tlumí karcinogenezi skrze p38-MAPK. Konstitutivní aktivace signální dráhy p38-MAPK je také příčinou onkogeny indukované senescence (viz 2.3.2.2), replikační senescence a kontaktní inhibice (shrnutí v Pan *et al.*, 2009). ROS vyvolávají mutace, které jsou potlačitelné jejich atenuátory („Ros scavengers“) (Morgan *et al.*, 2003).

2.3.2.4 Chemicky indukovaná předčasná senescence

Chemicky indukovaná senescence představuje geneticky kódovaný buněčný program, který může být indukován *in vitro* i *in vivo* (Ronninson I.B., 2003) chemicky různorodými látkami, jež vyvolávají poškození DNA podobné působení ionizujícímu záření (radiomimetiky). Chemoterapeutika používaná pro léčbu maligních nádorů jsou designována na odstranění nemoci skrze deprivaci nádorových buněk v jejich reprodukčním potenciálu. Tento efekt je realizován indukcí apoptózy, ale často v případě nedokonalého nebo i vedlejšího účinku („bystander effect“) chemoterapeutika (metabolický rozklad) (Kuong *et al.*, 2009) dochází pouze ke ztrátě buněčného sebeobnovného potenciálu („self-renewal potential“) a podstoupení trvalé zástavy cyklu podobné replikační senescenci (Gewirtz *et al.*, 2008). Předčasná senescence těchto buněk je indukována nereparovatelným poškozením DNA, které potlačuje proliferaci buněk indukcí replikačního stresu, a byla nazvána chemicky indukovanou buněčnou senescencí (*Chemically-Induced cellular Senescence*).

Mezi látky používané v chemoterapii patří např. inhibitory topoizomerázy II etoposid (Caldecott *et al.*, 1990), actinomycin D (Potmesil *et al.*, 1988) a adriamycin (Elmore *et al.*, 2002), inhibitor topoizomerázy I kamptotecin (Rothenberg M.L., 1997), látka spojující řetězce kovalentní vazbou DNA cisplatina (Gonzalez *et al.*, 2001), inhibitor ribonukleotid reduktázy hydroxymočovina (Saban *et al.*, 2009), inhibitor DNA polymeráz α a δ afidikolin (Dhillon *et al.*, 2003), inhibitor histondeacetyláz trichostatin A (Yoshida *et al.*, 1995) a antibiotikum distamycin A (Chandra *et al.*, 1970), popř. látky s nepřímým účinkem na DNA (např. paclitaxel nebo vinkristin proti polymeraci mikrotubulů) (Gewirtz *et al.*, 2008). S.J. Robles zjistil, že cisplatina, adriamycin a etoposid zastavují buněčný cyklus a vyvolávají PS u heterogenní populace buněk v délce několika málo dní. Cisplatina dovede

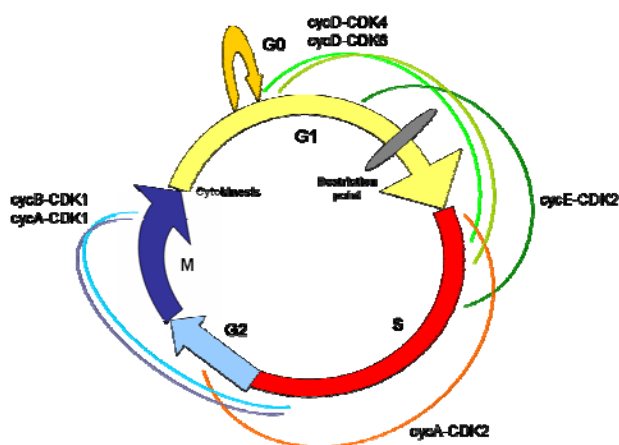
vytvořit tento blok dokonce s minimální toxicitou, ale kamptotecin buňky zastavuje jen dočasně, protože po odmytí z média dochází k obnovení proliferace (Robles *et al.*, 1999).

Mechanismem účinku všech genotoxických látek je indukce SSB a DSB. V případě, že látka indukuje pouze SSB, toto poškození je při opravě konvertováno v mnohem závažnější DSB. Zlomy v DNA jsou různě účinné podle toho, jaké geny přerušují (Limoli *et al.*, 1996). Některé látky vyvolávají zlomy DNA nepřímo, např. bleomycin skrze produkci ROS (Huang *et al.*, 1996). Jiné látky indukují více stejně závažných účinků, např. actinomycin D inhibuje kromě topoizomerázy II rovněž topoizomerázu I a také transkripci (Froelich-Ammon *et al.*, 1995), nebo hydroxyurea kromě inhibice ribonukleotid reduktázy také svou nestabilitou produkuje ROS (Kuong *et al.*, 2009).

Chemicky indukovaná senescence je charakterizovaná podobnými vlastnosti jako replikační senescence. Buňky se mění morfologicky, jsou větší a cytoplazmu mají bohatou na stresová granula (Robles *et al.*, 1998). Exprese proteinů prezentuje např. zvýšení SA- β -gal (Janderová-Rossmeislová *et al.*, 2007) a proteinů inhibujících buněčný cyklus: p53, p21, pRb a p16/ARF. Mezi další změny patří PDDF, SAHF, tvorba mikrojader (Blažková *et al.*, manuskript v revizi) a rezistence k proapoptotickým stimulům (Campisi *et al.*, 2007).

2.4 Buněčný cyklus senescentní buňky

Buněčný cyklus normálních buněk je v každém okamžiku kontrolován komplexem cyc/CDK (CYClin/CDK), které jsou stimulovány úspěšným dokončením jedné fáze před vstupem do následující fáze (viz obr. 2-8) (Lukas *et al.*, 2004).



Obrázek 2-8: Schéma buněčného cyklu savčí buňky s komplexem cyc/CDK (vytvořeno podle Draetta G.F., 1994).

Jejich funkce je ovlivněna inhibitory, které jsou v případě poškození DNA aktivovány známými drahami ATM-CHK2-p53-p21 a p16-pRb (viz 2.2.1.3.1). Mezi inhibitory CDK kromě rodiny WEE1/Myt1 (Touny *et al.*, 2006) patří rodiny INK4 (*Inhibitor of Kinase 4, inhibitor kinázy 4*) a CIP (*CDK Inhibitory Proteins, inhibiční proteiny CDK*). Rodina INK4 inhibuje specificky jen komplex cycD/CDK4 a cycD/CDK6 a zahrnuje p15^{INK4B} (dále jen p15), p16, p18^{INK4C}, p19^{INK4D} (myší homolog p14). Do rodiny CIP (nebo také KIP), která inhibuje všechny komplexy cyc/CDK, patří proteiny p21, p27^{KIP1} (dále jen p27), p57^{KIP2} (shrnutí v Ortega *et al.*, 2002). Z těchto inhibitorů mají v indukci senescence nejdůležitější roli p16, p21 a p17, které jsou součástí signálních drah: pRb-p16, p14/ARF-p53-p21 a PTEN-p27 (viz obr. 2-9).

2.4.1 Kontrolní bod G1/S

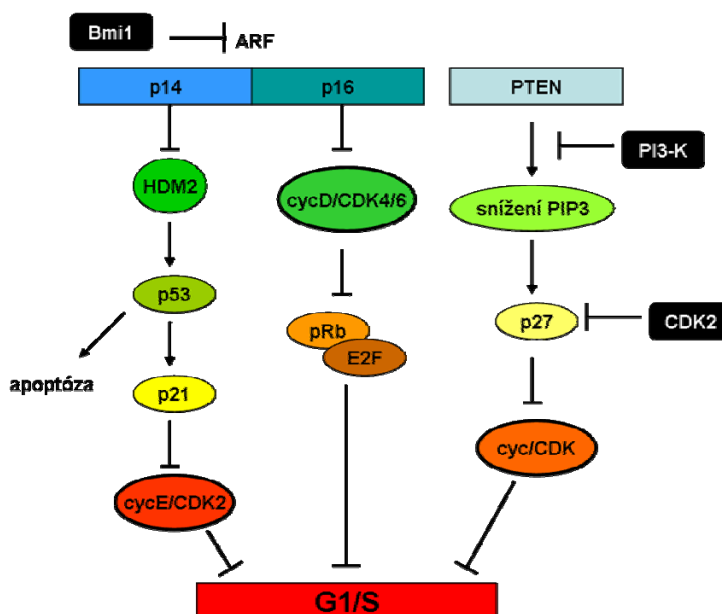
Zástava buněčného cyklu lidských buněk na přelomu fází G1/S je realizována předně aktivací drah p14-p53-p21 a p16-pRb (*Retinoblastoma protein, protein retinoblastomu*) (Pascal *et al.*, 2005). Poškození DNA v S-fázi je monitorováno třemi kontrolními body (Bartek *et al.*, 2004). Rozhodnutí o tom, zda konkrétní buňka zastaví proliferaci nebo přejde do apoptózy, závisí na mnoha faktorech, ke kterým se řadí mutace, inaktivace regulačních komponent cyklu, přítomnost mitogenů, specifita buněčné linie a míra a typ poškození DNA (White E., 1996). V současné době není známo, jaká signalizace řídí indukci senescence. Bylo zjištěno, že buňky hlodavců nepodstoupí senescenci v případě, pokud je inaktivována dráha p53-p21. Lidské buňky ve srovnání s myšími tuto senescenci podstupují, protože dráha p53-p21 je nahrazena p16-pRb (shrnutí v Cichowski *et al.*, 2008).

p53 je protein s velmi krátkým poločasem, který je ve své prosenescentní a proapoptotické aktivitě regulován zejména fosforylacemi, acetylacemi a ubiquitylacemi (viz 2.2.1.4.1). Proteiny p19 a p16 jsou kódovány jedním lokusem genu ARF. Poškození DNA aktivuje expresi p19, jenž inhibuje interakci HDM2 s p53. Tím p53 stabilizuje a umožňuje aktivaci jeho přímého efektoru p21, který inhibuje cycE/CDK2 (shrnutí v Besson *et al.*, 2008). Exprimovaný p16 inhibuje cycD/CDK4 a tím nedovoluje indukovat uvolnění E2F (*Eukaryotic transcription Factor 2, eukaryotní transkripční faktor 2*) z asociace s pRB (viz obr. 2-6 a 2-9) (Dimri *et al.*, 1996). S oběma těmito drahami interferuje několik onkogenů. Nadměrná exprese onkogenu Bmi1, což je člen komplexu PRC1 (*Polycomb Repressive Complex 1*), vede ke konstitutivní represi p19, přemíra

exprese HDM2 destabilizuje p53 a přemíra exprese cyklinu D nebo CDK4 obchází p16. Všechny tyto interakce inhibují indukci senescence (shrnutí v Bringold *et Serrano*, 2000).

Mezi proteiny, které jsou součástí zpětnovazebných smyček p53, patří Wnt/ β -catenin, IGF1/PKB (*Insuline-like Growth Factor/Protein Kinase B*, proteinová kináza B), pRb/E2F, p38-MAPK, cyc/CDK, p19/ARF a Jak/STAT (shrnutí v Harris *et Levine*, 2005). Např. p38-MAPK indukuje expresi p16 nebo p19/ARF, které s p53-p21 vedou k navození Ras-indukované senescence *in vivo* (Pan *et al.*, 2009). Aberantní aktivace Ras vyvolává senescenci charakterizovanou indukci obou drah (p53-p21 a pRb-p16). Inhibitor p16 bývá u některých typů buněčné senescence nahrazen p15 (Collado *et al.*, 2005).

PTEN (*Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosom TEN*, homolog fosfatázy a tensinu deletovaný na chromozomu 10) je nádorový supresor, který je antagonistou kináz PI3-K a katalyzuje ve funkci fosfatázy konverzi fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátu (PIP3) na 4,5-difosfát (PIP2). Přemíra exprese PTEN vede ke snížení PIP3 a k indukci inhibitoru CDK p27 (viz obr. 2-8) (shrnutí v Bringold *et Serrano*, 2000).



Obrázek 2-9: Schéma signalizace podporující indukci senescence (převzato a upraveno z Bringold *et Serrano*, 2000).

2.4.2 Kontrolní body S-fáze

Od S-fáze až po část G2-fáze koordinují buněčné procesy tři kontrolní body, které monitorují replikaci DNA. Replikace je inhibována v případě rozpadu enzymatického komplexu replikační vidličky v odpovědi na různé stresové stimuly, např. deplece některého z dNTP, chemická inhibice DNA polymerázy nebo poškození DNA. Buňky vyvinuly k prevenci iniciace replikace DNA také mechanismus kontroly opětovné replikace

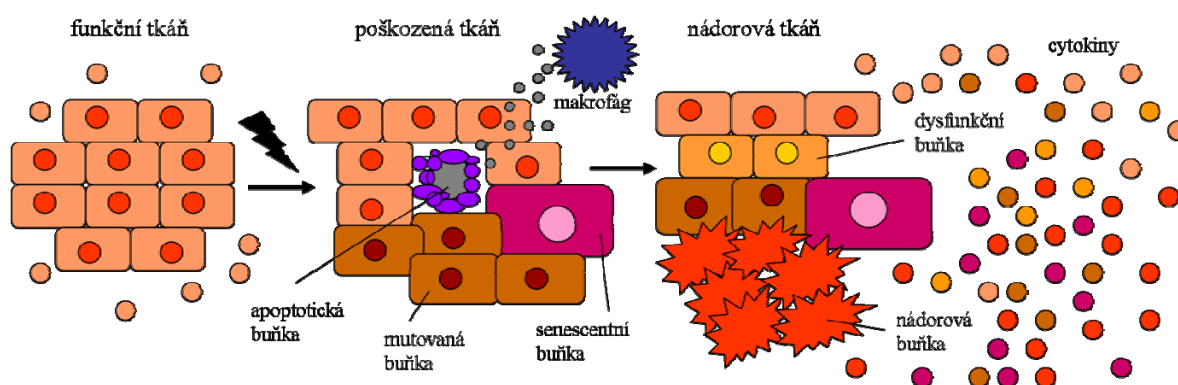
již jednou replikovaných úseků DNA a dovolují návratu k replikaci po opravení poškozené DNA nebo po obnovení poměru dNTPs (Brachmann *et al.*, 2005). Uvedené vlastnosti mají na starosti celkem tři kontrolní body S-fáze: replikační, S/M kontrolní bod a intra-S-fázní kontrolní bod.

Replikační kontrolní bod má dvě funkce: inhibuje iniciaci rizikové replikace DNA skrze deaktivaci komplexů cyc/CDK typických pro S-fázi (cycE/CDK2) a chrání schopnost replikační vidličky pokračovat v syntéze DNA. U inhibice replikačních vidliček se uplatňují senzory PCNA-9-1-1, s nimi spojené ATR a ATRIP a signalizace skrze CHK1 (viz 2.2.1.1). Kontrolní bod S/M zabezpečuje, aby buňky nepřešly do mitózy, dokud není genom kompletně zreplikován. Deficit funkce tohoto bodu způsobuje mitotické katastrofy. Intra-S-fázní kontrolní bod inhibuje replikaci po vzniku poškození DNA mimo aktivní replikony (viz 2.2.1.3.1.1) (shrnutí v Bartek *et al.*, 2004).

2.4.3 Tkáňové mikroprostředí senescentních buněk

Působení chemoterapeutik nebo ozařování vedlejším efektem usmrcuje buňky tkáně, které nejsou nádorové, pravděpodobně skrze difúzi smrt-podporujících faktorů, produkovaných poškozenými buňkami. Tento vedlejší efekt chemoterapeutik kromě indukce buněčné smrti zastavuje i buněčný růst, vyvolává poškození DNA a také senzitivizuje buňky k aktivaci vnitrobuněčných drah monitorujících poškození DNA (Sedelníková *et al.*, 2007). Podobný účinek byl zjištěn *in vitro* při působení kondiciovaného média na normální buňky, které bylo získáno z buněk uvedených do předčasné senescence (Nováková *et al.*, manuskript v revizi; Rodier *et al.*, 2009). Protože senescentní buňky zůstávají metabolicky aktivní, sekretují množství solubilních látek, které mohou mít různé biologické aktivity na své okolí (Di *et al.*, 2008) (viz obr. 2-10).

Při studiu sekrece cytokinů senescentními buňkami *in vitro* bylo zjištěno, že kromě komponent extracelulární matrix, enzymů modifikujících matrix a dalších molekul, sekretují velké množství cytokinů, např. IL1 α , IL6, IL-8, IL24, TGF β a IFN β (Nováková *et al.*, manuskript v revizi). Některé z nich byly nalezeny i v sekretomu senescentních buněk benigních nádorů a preneoplastických lezí (Acosta *et al.*, 2008; Bartková *et al.*, 2006; Collado *et al.*, 2007; Di Micco *et al.*, 2006; Katakura *et al.*, 1999; Kuilman *et al.*, 2008; Michaloglou *et al.*, 2005). Působení různých cytokinů má na buněčnou proliferaci antagonistický efekt. Protože se vedle sebe současně vyskytují atrofie i hyperplazie, byla navržena hypotéza, že senescentní buňky *in vivo* mohou tumorigenezi podporovat i potlačovat (Campisi *et al.*, 2007).



Obrázek 2-10: Potenciální škodlivý efekt senescentní buňky ve tkáni. Změněný cytokinový profil sekretují buňky poškozené, nádorové i senescentní (převzato a upraveno z Campisi et al., 2007).

Schopnost některých chronicky působících cytokinů vyvolat poškození DNA *in vitro* indikuje jejich nepříznivou roli v udržování tkáňové homeostázy. Působení IFN β vyvolává tvorbu ROS, které poškozují DNA a aktivují ATM-CHK2-p53 (Moisseva et al., 2006). Prozánětlivé cytokiny mohou vyvolat poškození u buněk mimo primární nádor a tím přispět k rozšíření buněk s nestabilním genomem (Campisi et al., 2005). Výzkum se nyní soustředí na rozřešení sekrece cytokinů senescentními buňkami skrze indukci cytokinových drah. Mezi jednu z takových signalizací patří také signální dráhy Jak/STAT, které jsou IFNs nejen indukovány, ale také indukují expresi IFNs.

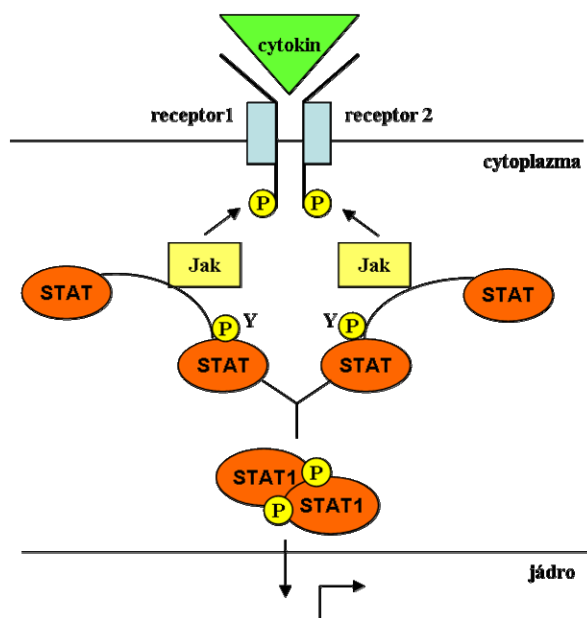
2.5 Signální dráhy JAK/STAT

DDR je velmi komplexní a vede skrze několik různých větví, které jsou aktivovány kinázou ATM. Jedna z těchto větví spojuje substrát ATM, kterým je p53 (viz 2.2.1.3 a 2.2.1.4.1), také se signální dráhou Jak/STAT. Nejdůležitějším členem dráhy je STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*, signální transduktor a aktivátor transkripce 1). Tento transkripční faktor ovlivňuje DDR regulaci exprese 53BP1 a MDC1 (Townsend et al., 2005), aktivitu p53 skrze indukci exprese jeho substrátů a stabilitu p53 skrze inhibici HDM2 (shrnutí v Youlyouz-Marfak et al., 2008). Signální dráhy Jak/STAT mají důležitou roli jak v nádorové supresi, tak i podpoře růstu nádoru (Turkson et Jove, 2000). Nádorový supresor STAT1 je v antagonistickém vztahu s dalším důležitým členem dráhy, onkogenem STAT3 (a popř. STAT5). Aktivace Jak/STAT byla prokázána také u buněk, které podstoupily chemicky indukovanou buněčnou senescenci (Nováková et al., manuskript v revizi).

2.5.1 Obecný mechanismus aktivace Jak/STAT

Transkripční faktory STAT mají důležitou roli v buněčném růstu, promoci apoptózy, suprese karcinogeneze a také v regulaci funkce imunitního systému (Shuai K., 2006). Do

dnešního dne bylo identifikováno celkem sedm členů rodiny STAT: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B a STAT6 (Ebong *et al.*, 2004). Všechny STAT proteiny jsou cytoplazmatické a aktivované Jak kinázami (*Janus Kinase*) fosforylací na některém z tyrozinů. Rodina Jak kináz zahrnuje Jak1, Jak2, Jak3, Jak4 a Tyk2, které jsou aktivované membránovými receptory pro cytokiny (Darnell *et al.*, 2004). Ligand vážící se na receptor způsobí jeho dimerizaci doprovázenou konformační změnou, jež vede k autofosforylaci částí receptoru a přenosu tohoto signálu na solubilní Jak kinázy a z nich na dále STAT. Jelikož STAT obsahují SH2 (*Src Homology domain 2, homologní doména Src*), mohou skrze ni dimerizovat a umožnit aktivační autofosforylaci na tyrozinech své transaktivační domény (Bluyssen *et al.*, 1996). Aktivované dimery STAT-STAT jsou translokovány do jádra, kde ve funkci transkripčních aktivátorů spouští expresi STAT-responzivních genů (Liao *et al.*, 2000) (viz obr. 2-11).



Obrázek 2-11: Schéma obecné aktivace Jak/STAT.

Strategie pro vývoj chemoterapeutik se vyvíjejí velkou rychlostí a jsou cíleny na mnohdy velmi detailní poruchy v nitrobuněčné signalizaci nádorových buněk. Protože signální dráha Jak/STAT je narušena (nejčastěji dochází k aberantní aktivaci) u velkého množství typů nádorů, patří její regulace mezi jeden z předpokladů cílené suprese nádorového růstu. Mezi mechanismy, které jsou využívány pro výzkum regulace Jak/STAT, je zahrnuta RNAi ovlivňující expresi STAT, dále protilátky a antagonistické molekuly neutralizující receptory aktivačních ligandů, inhibitory S/T-kináz nebo Y-kináz interferujících s Jak/STAT, proteiny regulující fyziologickou aktivaci a inhibující

dimerizaci nebo způsobující rozpad dimerů komponent dráhy, inhibitory translokace STAT a jejich vazby na DNA ([shrnuto v Turkson et Jove, 2000](#)).

2.5.2 Regulace JAK/STAT cytokiny

V tkáňovém mikroprostředí buněk dochází k interakcím cytokinů s receptory na buněčném povrchu, odkud mohou skrze signální dráhy měnit expresi genů v jádře v řádech několika minut. Transkripční faktory rodin STAT a C/EBP a NF- κ B jsou členy dobře prostudovaných signálních kaskád, které jsou aktivované právě cytokiny. Fyziologická funkce proteinů STAT byla analyzována s využitím genetických delečních studií. Jejich výsledkem bylo zjištění, že různé proteiny STAT mají po aktivaci cytokinového receptoru schopnost indukovat transkripci vysoce specifických genů.

Dráhy Jak/STAT jsou aktivovány více než 50 druhy cytokinů/chemokinů, hlavně IFNs (*InterFeroNs*, interferony α , β a γ) a ILs (*InterLeukins*, interleukiny 2,3,4,5,6,7,10 a 12) dále GM-CSF (*Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor*, faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů), EPO (*ErythroPOetin*, erythropoetin), prolaktinem, GF (*Growth Factor*, růstový hormon), EGF (*Epidermal Growth Factor*, epidermální růstový faktor), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*, růstový faktor odvozený od krevních destiček) a dalšími ([Shuai K., 2006](#)). Podle druhu cytokinu se rozlišují např. dráhy IFN-Jak/STAT nebo IL6-Jak/STAT, které řídí transkripční aktivaci ISGs (*Interferon-Stimulated Genes*, interferon-stimulovaných genů) ([Platanias L.C., 2003](#)). Signální dráha IFN-Jak/STAT je kaskádou závislou na IFN, která aktivuje ISGs zejména skrze STAT1. Dráha IL6-Jak/STAT je závislá na IL6 a EGF, jež aktivuje ISGs zejména skrze STAT3 ([Norkina et al., 2008](#)).

Vedle IFN-stimulované kanonické signální dráhy Jak/STAT je postupně odkrývána také komplikovaná síť dalších signálních drah, skrze něž jsou aktivovány stovky genů stimulovaných interferony ([Der et al., 1998](#)). Mezi tyto ISGs patří např. nádorové supresory p53 a IRF1 ([Takaoka et al., 2003](#)). Jednou z důležitých drah je také p38-MAPK (viz 1.5.2.1), která je indukována IFN typu I. Tato aktivace zahrnuje protein mTOR, který skrze kinázu p70S6 a deaktivaci translačního represoru eIF4-BP1 (*Eukaryotic-Initiation-Factor 4-Binding Protein 1*) reguluje translaci, také inhibuje HMD2 a WEE1 kinázu důležitou pro deaktivaci CDK na Y14 a T15 (viz 2.4.1) ([Kaur et al., 2004](#)). Dalšími proteiny, které jsou rekrutovány k receptoru aktivovanému naopak IFN typu II, jsou např. Src, PI3-K a MyD88 (*MYeloid Differentiation primary response gene 88*). Tyto aktivují kaskády MAPK, Akt/PKB, CaMKII (*CALcium/calMODulin KInase II*) a IKK/NF- κ B

(Inhibitor Kappa B Kinase/Nuclear Factor Kappa B, inhibitor kinázy kappaB/jaderný faktor kappaB) (shrnutí v Gough *et al.*, 2008).

2.5.2.1 Interferony a geny stimulované interferony

Rodina cytokinů typu interferonů zahrnuje IFN typu I ($\alpha, \beta, \delta, \kappa$ a ω) a typu II (γ). Interferony představují druhově specifickou pleiotropní skupinu cytokinů, které mají důležitou roli v antivirové a imunomodulační odpovědi (Platanias L.C., 2003). K dosažení vhodné fyziologické reakce na různé podněty intereagují IFNs synergicky (Coccia *et al.*, 1995).

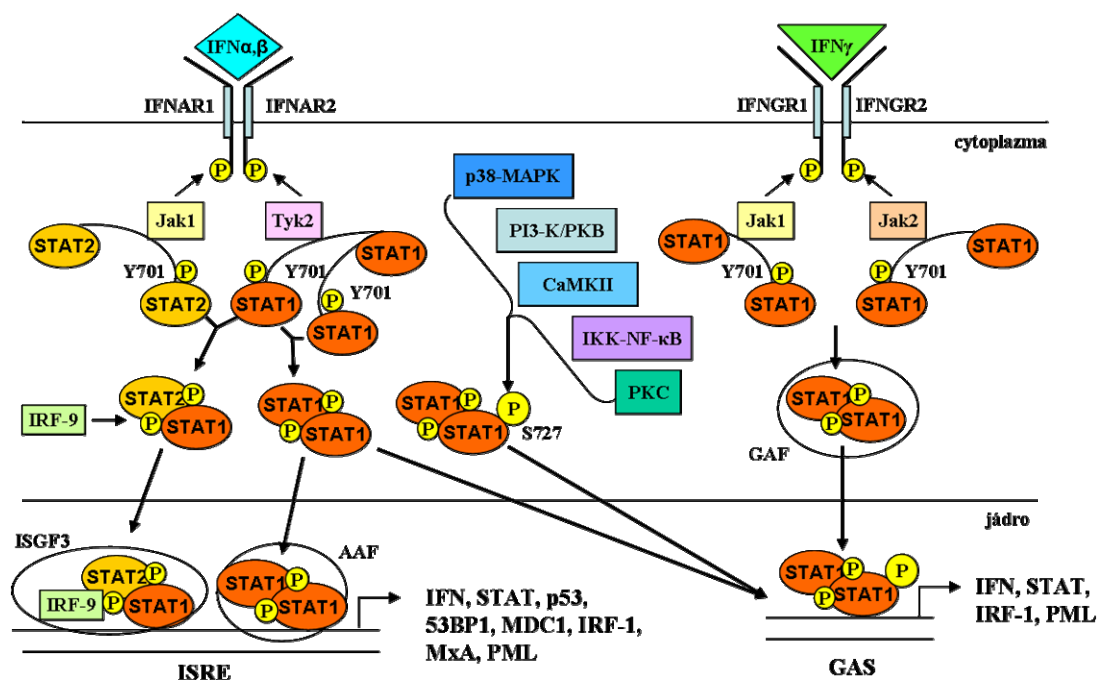
Interferony typu I jsou syntetizovány a sekretovány buňkami v reakci na přítomnost virové nebo syntetické dsRNA v cytoplazmě. IFN typu II jsou produkovány v odpovědi na mitogeny a antigeny (Norkina *et al.*, 2008). Oběma typům IFN je společné, že jsou jejich promotory mimo jiné složeny z jednoho nebo dvou tradičních elementů: ISRE (*Interferon Sensitive Responsive Element, interferon senzitivní responzivní element*) a GAS (*Gamma Activated Site, gamma aktivované místo*) (Darnell *et al.*, 1994). Z těchto elementů jsou složeny také promotory genů, jejichž exprese je stimulována právě IFNs. Obecně existuje ISRE v promotoru ISGs někdy v mnoha kopiích a minoritně i několika variacích.

ISRE element je pro aktivaci IFN zcela nezbytný (Wesoly *et al.*, 2007) a je rozpoznáván homodimerem STAT1 nebo komplexem ISGF3 (*IFN-Stimulated Gene Factor 3, faktor genů stimulovaných interferony 3*), který je složený z heterotrimeru STAT1, STAT2 a IRF-9 (*Interferon Regulated Factor 9, interferon-regulačního faktoru 9, nebo také p48*) (Bluyssen *et al.*, 1996). STAT1 tedy může indukovat expresi IFNs a všech ISGs, které mají v promotoru stejný element.

2.5.2.1.1 Aktivace STAT1

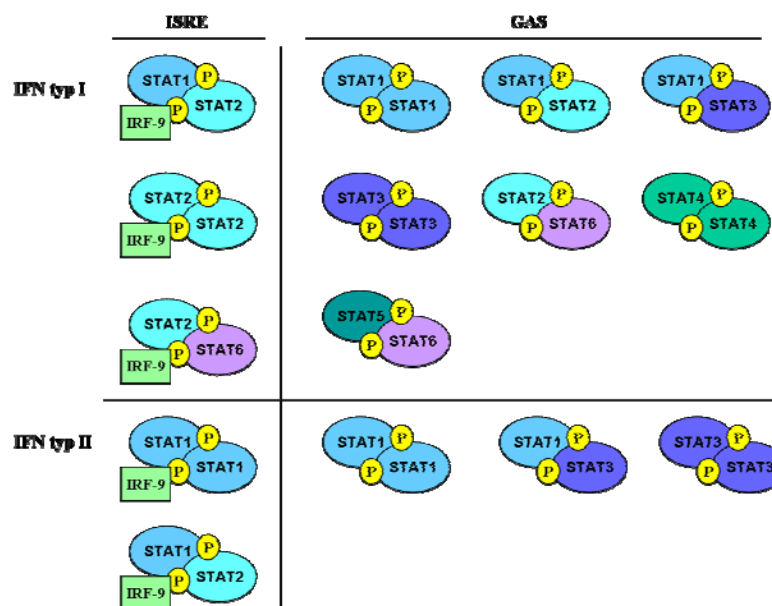
STAT1 je aktivován fosforylací na Y701, která vede k dimerizaci, translokaci do jádra, kde spouští transkripci ISGs (shrnutí v Zhang *et al.*, 2006). Navíc k této fosforylaci je také aktivován na S727 skrze p38-MAPK dráhu v odpovědi na IFN α a některé typy buněčného stresu (Platanias L.C., 2003). Serinová fosforylace je nezávislá na aktivaci tyrozinové a nemá žádný účinek na formaci dimerů STAT1 již aktivovaných na tyrozinu, ani na jejich translokaci do jádra nebo vazbu na DNA. Nicméně aktivace přes S727 umožňuje maximální aktivaci STAT1, ale také proteazomovou degradaci (Zhang *et al.*, 2006). STAT1 je aktivován na S727 kromě p38-MAPK také v odpovědi na mnoho druhů

kináz, např. PI3-K/PKB (Nguyen *et al.*, 2001), PKC (Protein *K*inase *C*, protein kinase C) (Uddin *et al.*, 2002) a CaMKII (Nair *et al.*, 2002) (viz obr. 2-12).



Obrázek 2-12: Schéma signalizace IFN-Jak/STAT (převzato a upraveno z Darnell *et al.*, 1994).

STAT1 tvoří dimery také se STAT2 a STAT3. Heterodimery STAT1-STAT2 jsou silnějšími transkripčními induktory než homodimery STAT1-STAT1. V odpovědi na indukci IFN typu I jsou transkribovány STAT1 α a β , STAT2, 3, 4, 5 a 6 (Wesoly *et al.*, 2006). Interferony typu II indukují transkripci STAT1 α , STAT2 a 3. Aktivované dimery indukují expresi ISGs s elementy ISRE a/nebo GAS v promotoru (shrnutí v Zhang *et al.*, 2006) (viz obr. 2-13).



Obrázek 2-13: Transkripční komplexy STAT aktivované v odpovědi na IFN (převzato a upraveno z Wesoly *et al.*, 1994).

2.5.2.2 Interferonem regulované faktory

IRF byly poprvé objeveny jako jaderné transkripční aktivátory lidského genu pro IFN β . V současné době rodina IRF obsahuje 9 členů: IRF-1, IRF-2, IRF-3, IRF-4, IRF-5, IRF-6, IRF-7, IRF-8 (nebo také ICSPB, *IFN Consensus-Sequence Binding Protein*, protein vázající konsenzuální sekvenční IFN) a IRF-9 (nebo také ISGF3 γ či p48, viz 2.5.2.1). Všichni členové mají důležitou úlohu v regulaci procesů imunity, protizánětlivé odpovědi a programované buněčné smrti (shrnuto v Clarke *et al.*, 2004). Rodina IRF je charakterizována konzervovanou DNA-vazebnou doménou na N-konci, která má okolo 120 aminokyselin a rozeznává sekvenční DNA obsahující ISRE element. IRF jsou indukované interferony (patří mezi ISGs) a fungují jako sekundární interferonová odpověď (Fujita *et al.*, 1989).

IRF-1 má v normálních buňkách nízkou hladinu exprese, ale při stimulaci virovou infekcí nebo přímo IFN dochází k rychlé indukci. Dalšími induktory IRF-1 jsou TNF α (*Tumor Necrosis Factor*, nádorový faktor nekrózy), IL-1, IL-6 a dsRNA (Kröger *et al.*, 2002). Naopak u IRF-2, který také odpovídá na virovou infekci a interferony, je hladina jeho exprese v normálních buňkách běžně na vysoké úrovni. IRF-2 a IRF-1 jsou antagonisté. IRF-2 potlačuje expresi IFN β inhibicí IRF-1, který ji naopak aktivuje. IRF-2 pozitivně ovlivňuje buněčný růst, přemíra jeho exprese podporuje maligní transformaci, ale může být blokována ko-expresí IRF-1. IRF-1 a IRF-2 jsou schopny vázat se na element ISRE v promotoru pro IFN α a IFN β (Coccia *et al.*, 1995). Bylo zjištěno, že IFN γ stimuluje

také geny, které nemají GAS element, právě skrze aktivaci IRF-1, jež spouští expresi ISGs (Wesoly *et al.*, 2007).

Další funkcí faktorů rodiny IRF je kromě regulace ISGs i regulace vlastní exprese. IRF-1 aktivuje promotor pro IRF-2, který inhibuje transkripci genů aktivovaných IRF-1. Protože je akumulace IRF-2 relativně stabilnější ve srovnání s IRF-1 díky dlouhému poločasu rozpadu, IRF-2 funguje jako negativní regulátor limitující indukovanou aktivitu IRF-1 (Kröger *et al.*, 2002).

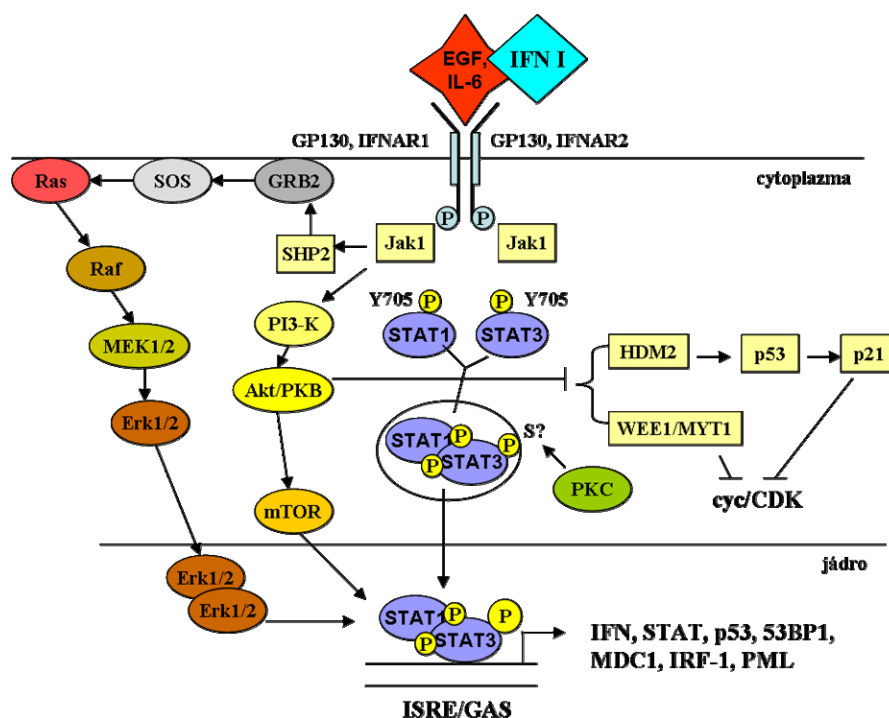
Kromě IRF-1 byly v odpovědi na IFN typu I mezi členy rodiny IRF identifikovány ještě další regulátory ISGs: IRF-3, IRF-5 a IRF-7. Z nich IRF-7 formuje homodimery nebo heterodimery s IRF-3. IRF-3 odpovídá více na aktivaci IFN β než na IFN α a IRF-7 přesně naopak. IRF-7 je zahrnut do pozdní fáze indukce interferony a protože je pod transkripční kontrolou interferonů, přispívá k pozitivní zpětnovazebné smyčce regulující rozsáhlou produkci IFN v antivirových imunitních reakcích. Faktory IRF-3 a IRF-7 jsou konstitutivně exprimovány do cytosolu v transkripčně neaktivní formě, která se stává aktivní skrze fosforylaci, dimerizaci a translokaci do jádra po virové infekci (shrnutí v Kim *et al.*, 2007).

Bylo zjištěno, že u myších primárních fibroblastů nedochází po poškození DNA k indukci senescence, pokud je IRF-1 nebo p53 inhibován. Kromě p53 aktivuje p21 u myších buněk také IRF-1 (Tanaka *et al.*, 1996).

2.5.2.3 STAT2 a další členové rodiny STAT

STAT2 je aktivován fosforylací také na Y701 v odpovědi na IFN typu I, kdy oligomerizuje se STAT1 a IRF-9 do komplexu ISGF3 (viz 2.5.2.1). STAT1 také dimerizuje se STAT2, který ale není schopen vazby na GAS element (Wesoly *et al.*, 2007). Zatímco STAT1 i 2 byly identifikovány jako nádorové supresory, STAT3 a STAT5 byly identifikovány jako silné protoonkogeny (Turkson *et Jove*, 2000).

Mezi induktory STAT3 patří IL-6 a EGF i IFN α . STAT3 je aktivován fosforylací na Y705, která indukuje dimerizaci se STAT1 a lokalizaci dimerů do jádra. STAT3 má 2 izoformy: STAT3 β , který je aktivován IL-6 a EGF, a STAT3 α , jež je aktivován pouze EGF. Expres obou izoform závisí na buněčném typu, expozici ligandu a stupni zralosti buněk (Ebong *et al.*, 2004). Kontrétním příkladem perzistentní aktivace STAT3 je aberantní působení IL-6, které může být blokováno inhibitory kináz Jak (Catlett-Falcone *et al.*, 1999) (viz obr. 2-14). STAT3 je aktivován kromě Y také na S skrze PKC (Turkson *et Jove*, 2000).



Obrázek 2-14: Schéma signalice IL6-Jak/STAT.

Vysoká exprese STAT4 je důsledkem indukce IL-12 hlavně v myeloidních buňkách a buňkách varlat. STAT5 je aktivován prolaktinem, IL-3 a IL-7, a je spolu s Crk1 (*v-crk protooncogen*) v komplexu, který aktivuje ISGs s GAS elementem v promotoru. STAT6 je zahrnut do dráhy aktivované IL-4 a IL-13 a fosforylován na Y641. Navíc je aktivován v B-buňkách IFN α , kde formuje transkripční komplex ISGF3 (shrnuto v Takeda *et al.*, 2000).

2.5.2.4 Inhibitory signální dráhy Jak/STAT

Existují různé mechanismy regulace odpovědi buňky na různé cytokinové stimuly skrze Jak/STAT. Kináza Jak aktivovaná po přijetí ligandu i samotné dimery STAT jsou deaktivovány defosforylací PTPázou (*Protein Tyrosine Phosphatase, proteinovou tyrozinovou fosfatázou*). Byly popsány také přímé inhibitory cytokinové signalizace SOCS (*Suppressors of Cytokine Signalling, supresory cytokinové signalizace*), které deaktivují členy rodiny Jak a tím i STAT. Např. SOCS3 je negativní regulátor cytokinové signalizace indukované IFN typu II a IL-6, SOCS1 inhibuje produkci IL-2, 6, 7, 12 a 15, které jsou také indukovány IFN typu II. Oba inhibitory negativně regulují odpověď buňky na IFN typu I (shrnuto v Norkina *et al.*, 2008).

Transkripční aktivita proteinů STAT je inhibována členy rodiny PIAS (*Protein Inhibitor of Activated STAT*). Savčí rodina PIAS sestává ze čtyř členů: PIAS1, PIAS3,

PIASx a PIASy. Proteiny PIAS mohou inhibovat transkripci STAT blokací DNA-vazebné aktivity jejich aktivátorů, vazbou další koregulatorů jako jsou HDACs (*Histone DeACetylases*, *histondeacetylázy*) nebo podporou SUMOylace transkripčních faktorů proteinů STAT (shrnutí v Müller *et al.*, 2004).

SUMOylace je forma post-translační modifikace, která je tvořena podobně jako ubiquitylaci kovalentní isopeptidovou vazbou malého peptidu SUMO (*Small Ubiquitin-related MOdifier* o 11,5 kDa) (Sternsdorf *et al.*, 1997). Interakce PIAS a STAT vyžaduje stimulaci cytokiny, protože PIAS reguluje pouze dimery STAT. Bylo objeveno, že PIAS1 a PIAS3 inhibují transkripční aktivaci STAT1 a STAT3 vazbou a blokací přístupu k sekvencím DNA, které STAT rozeznávají. PIASx a PIASy naopak regulují HDACs, které remodelují chromatin a znemožňují vazbu STAT na DNA. STAT1 může být SUMOylován na K703 po indukci IFN γ (shrnutí v Liao *et Shuai*, 2000). Fyziologická úloha SUMO-ligázové aktivity PIAS však zůstává zatím neznámá. Bylo zjištěno, že PIASy (SUMO-3) je nezbytná pro indukci senescence u normálních buněk (Bischof *et al.*, 2006). Experimenty s řízenými mutacemi SUMO-specifických míst na molekule STAT nevedou k jednotným výsledkům (viz Rogers *et al.*, 2003; Ungureanu *et al.*, 2003). SUMOylace pomocí PIAS3 byla nalezena také u IRF-1, který je stimulován STAT3 (Nakagawa *et Yokosawa*, 2002).

Mezi ISGs, které jsou indukovány v buněčné senescenci replikační i předčasné patří proteiny MxA (Aebi *et al.*, 1989) a PML (*ProMyelocytic Leukemic protein*, *promyelocytický leukemický protein*) (Pearson *et al.*, 2000).

2.6 Protein MxA

Protein MxA je cytoplazmatická GTPáza patřící do rodiny dynaminů, která se řadí k ISGs a k efektorům odpovědi buňky na virovou infekci (Ronni *et al.*, 1995). Jeho fyziologická role je prozatím neznámá, bylo zjištěno, že inhibuje replikaci virů. MxA tvoří v reakci s virovým nukleokapsidovým proteinem inkluze v perinukleárním prostoru (Kochs *et al.*, 2004). Bylo také zjištěno, že asociuje s hladkým ER (*Endoplasmatic Reticulum*, *endoplazmatické retikulum*) (Acola *et al.*, 2002). Myší analog Mx1 je po stimulaci IFNs translokován do jádra, kde kolokalizuje s jadernými tělísky proteinu PML (viz 2.7.2) a interaguje s proteiny BLM, DAXX (*Death Associated protein 6*), SUMO-1 a Sp100 (viz 2.7) (Engelhardt *et al.*, 2001). MxA je zvýšen u chemicky indukované senescence vyvolané dlouhodobou expozicí 5'-bromo-2'-deoxyuridinu (BrdU) (Nováková Z., manuskript v revizi). Nejnovějším poznatkem je schopnost Mx ovlivnit motilitu nádorových buněk, což

nabízí potenciální chemoterapeutické využití (Mushinski *et al.*, 2009). Protože je Mx jedním z ISGs, jeho exprese je také stimulována transkripčními faktory STAT.

2.7 Promyelocytický leukemický protein

PML byl původně identifikován u pacientů s APL (*Acute Promyelocytic Leukemia*, *akutní promyelocytická leukémie*). Toto onemocnění je charakterizované reciprokou chromozomální translokací t(15;17), která je příčinou fúze genu *PML* s genem *RARα* (*Retin Acid Receptorα*, *receptor retinové kyseliny*) (de Thé *et al.*, 1990). Fúzní proteiny PML-RARα a RARα-PML jsou zodpovědné za vznik leukémie s charakteristikou APL (shrnutí v Piazza *et al.*, 2001).

Protein PML je také spojen s replikační i stresem-indukovanou předčasnou senescencí (Ferbeyre *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2000; Janderová-Rossmeislová *et al.*, 2007). PML při zvýšené aktivaci indukuje senescenci skrze p53 (Pearson *et al.*, 2000). Ale v případě jeho deficitu nejsou myší buňky schopny podstoupit senescenci ani při stimulaci aberantní aktivací onkogenů (Ferbeyre *et al.*, 2000). Lidské buňky bez PML jsou méně citlivé na poškození DNA (Chang *et al.*, 1999) a dokonce po ozáření nepodstupují apoptózu (Bao-Lei *et al.*, 2006). Tyto skutečnosti indikují roli PML jako nádorového supresoru s důležitou úlohou v onkogeny-indukované předčasné senescenci (Pearson *et al.*, 2000). Protein PML je také zahrnut do buněčných procesů jako jsou regulace proliferace a DDR (Carbone *et al.*, 2002), udržení stability genomu (Wang *et al.*, 1998b) a apoptózy (Borden *et al.*, 1997). Důležitým aktivátorem exprese PML jsou interferony (Chelbi-Alix *et al.*, 1995), které spojují PML s antivirovou obranou buňky (Regad *et al.*, 2001).

2.7.1 Struktura proteinu PML

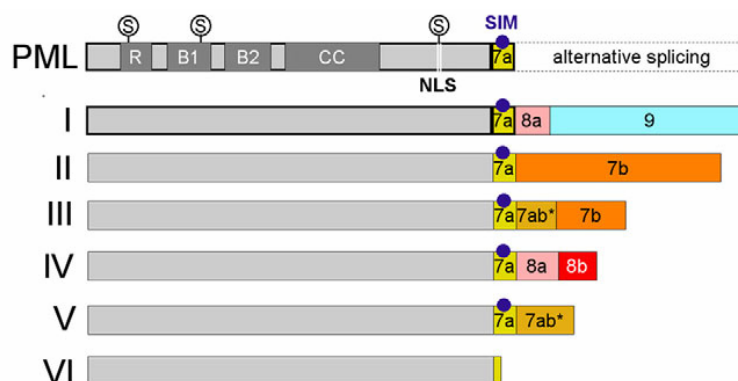
Protein PML obsahuje na N-konci doménu RING (*Really Interesting New Gene*), dva „B-boxy“ a doménu „coiled-coil“. Tyto 4 části se souhrnně nazývají motivem RBCC nebo také TRIM (*TRIPartite Motif*), díky kterému je PML řazen do rodiny proteinů TRIM (Jensen *et al.*, 2001). Proteiny s doménou RING mají E3-ubiquitin ligázovou aktivitu, RING se váže na konjugační enzym E2. Biologická funkce B-boxů zatím odhalena nebyla. Zato je známo, že RBCC motiv je důležitý pro oligomerizaci proteinu. Všechny tři zmíněné domény jsou nezbytné pro formaci inkluzí PML, které se vyskytují v buněčném jádru a nazývají se jaderná tělíska PML (*PML Nuclear Bodies*, *PML NBs*; *Nuclear dots 10*, *ND10*; *PML oncogenic domains*, *PODs*) (shrnutí v Chang *et al.*, 1995).

Pro sestavení oligomerů PML do PML NBs musí být protein post-translačně modifikován SUMOylací na K65, K160 a K490 (Sternsdorf *et al.*, 1997). Tato modifikace

je nezbytná také pro vazbu PML s dalšími proteiny, které jsou rovněž SUMOylovány, např.: RanGAP1, I κ B α , p53 a c-Jun (Best *et al.*, 2002). PML protein obsahuje navíc SIM (*SUMO-Interaction Motif*, *SUMO interakční motiv*), který není důležitý pro vlastní SUMOylaci, ale pro interakci se SUMOylovanými proteiny (Duprez *et al.*, 1999). PML NBs asociují s rodinou E3-ubiquitin ligáz SUMO jménem PIAS (Best *et al.*, 2002). Proteiny této rodiny jsou důležitými regulátory signální dráhy Jak/STAT v odpovědi na IFN (viz 2.5.2.4) a komponentami DDR v nekanonické signální dráze NF- κ B, kdy PIASy SUMOyluje NEMO a tím umožňuje jeho fosforylaci ATM po poškození DNA (Mabb *et al.*, 2006).

2.7.1.1 Izoformy PML

Lidský gen *PML* je díky alternativnímu sestřihu transkribován do nejméně 12 variant a každá kóduje vlastní proteinovou izoformu (viz obr. 2-15). Tyto izoformy mají nejednotnou nomenklaturu (viz tab. 2-2). Všechny izoformy sdílejí společný N-konec, ale odlišují se na svém C-konci (zejména díky sestřihu 7. a 9. exonu). Gen nese na 6. exonu NLS (*Nuclear Localization Signal*, *jaderný lokalizační signál*), který je vystřižen pouze u izoformy VII a proto je její lokalizace striktně cytoplazmatická. Tato izoforma tvoří cytoplazmatické subdomény v G1 fázi (*Gap1*) (Dellaire *et al.*, 2006, Everett *et al.*, 1999). Izoforma PML-I navíc obsahuje NES (*Nuclear Export Signal*, *jaderný exportní signál*) (Fagioli *et al.*, 1992). PML-IV neobsahuje SIM. Zastoupení jednotlivých izoform se odlišuje druhově i podle typu buňky jednoho organismu. Např. nádorové buňky U-2-Os exprimují nejvíce izoformu PML-V (> 60%), dále PML-II (> 30%) a PML-I a PML-VI (> 5%). Izoformy PML-II a PML-III mají tyto buňky na velmi nízké úrovni (Weidtkamp-Peters *et al.*, 2008).



Obrázek 2-15: Schéma doménových struktur PML. R) RING; B1 a B2) B-boxy; CC) Coiled coil, S) SUMO (převzato z Jensen *et al.*, 2001).

Tabulka 2-2: Nomenklatura a charakteristika izoform PML (převzato a upraveno z dizertace Dr. Lenky Janderové-Rossmeislové).

Jméno izoformy (GeneCard)	Jméno izoformy (Jensen)	Velikost proteinu	Počet amino-kyselin	Velikost mRNA	Počet nukleo-tidů	GeneBank#
PML 1	PML-I	97 kDa	882 AA	5600 bp	2648 bp	NM_033238
PML 2	PML-V?	67 kDa	611 AA	3751bp	1835 bp	NM_033240
PML 3	PML-II	90.6 kDa	824 AA	3073 bp	2474 bp	NM_033242
PML 5	PML-VI	61.6 kDa	560 AA	3171 bp	1682 bp	NM_033244
PML 6	PML-IV	69.6 kDa	633 AA	2254 bp	1901 bp	NM_002675
PML 7	PML-VIb	47.6 kDa	423 AA	1851 bp	1271 bp	NM_033246
PML 8	PML-VIIb	48.6 kDa	435 AA	1797 bp	1307 bp	NM_033247
PML 9	PML-II	90.7 kDa	829 AA	3088 bp	2489 bp	NM_033239
PML 10	PML-IVa	64.4 kDa	585 AA	2110 bp	1757 bp	NM_033249
PML 11	--	85.7 kDa	781 AA	2944 bp	2345 bp	NM_033250
PML 12	PML-V?	67.2 kDa	611 AA	3736 bp	1835 bp	NM_033245
	PML-III		641 AA			

PML bez NLS interaguje s Nup98 a 214 (*NUcleoPorin*, *nukleoporin*), které tvoří spolu s jinými Nup jaderné póry a jsou v APL inhibovány podobně jako PML. Tyto Nup a protein PML asociují v cytoplazmě buňky mezi M a G1-fázemi za tvorby komplexů s názvem CyPNs (*CYtoplasmic assemblies of PML and NucleoporinS*). Tyto komplexy jsou v G1-fázi při obnovení jaderné membrány lokalizovány do jaderných pórů a tvoří jasné kolokalizace nukleoporinů s PML NBs (Jul-Larsen *et al.*, 2008). To naznačuje odobnost s lokalizací MxA po virové infekci (viz 2.6)

2.7.2 Jaderná tělíska PML

Jaderná tělíska PML jsou dynamické makromolekulární kompartmenty buněčného jádra. Mají přibližně okrouhlý tvar a velikost se pohybuje mezi 0,2-1,0 μm (Everret *et Chelbi-Alix*, 2007). Frekvence výskytu PML NBs závisí na buněčném typu a stavu a v rámci tkání jednoho organismu se může počet lišit průměrně mezi 2-30 na jedno jádro (Koken *et al.*, 1995). Složení těchto kompartmentů se mění během buněčného cyklu a nejdramatičtější změny podstupuje v mitóze (Sternsdorf *et al.*, 1997). U pacientů s onemocněním APL je formace PML NBs inhibována a PML je dispergován po celém jádře (de Thé *et al.*, 1990).

2.7.3 Biologické funkce PML

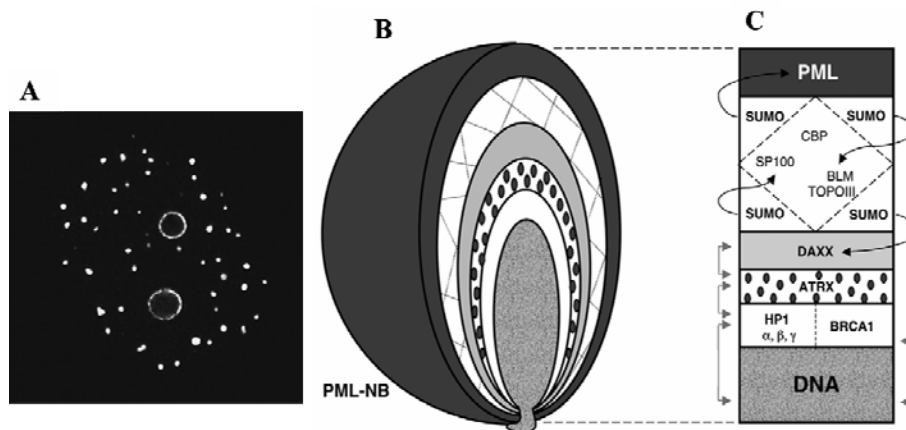
PML NBs formují komplex s ssDNA, hnRNA, virovým genomem a plazmidovou DNA (shrnuto v Luciani *et al.*, 2006). Exprese PML je potlačena ve tkání buněk s vysokým indexem proliferace (např. nádorová tkáň) a u některých terminálně diferencovaných buněk neuronů (Yu *et al.*, 2004). Ačkoliv jsou známy funkce dalších jaderných kompartmentů,

biologická funkce jaderných tělísek PML nebyla dosud definována. Jadérko, jaderné skrvny („speckles“) a Cajalova tělíska se účastní biogeneze ribozomů a zrání faktorů pro sestřih hnRNA včetně snRNP (Hemmerich *et al.*, 2005). Protože bylo popsáno již více jak 80 různých proteinů, které existují v permanentní nebo transientní asociaci s PML NBs, mohla by být tato uskupení skladovacími místy jádra, kde jsou drženy proteiny před svou aktivací nebo mimo místo svého aktivního působení (sekvestrace) (Bernardi *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2005). PML NBs reagují na externí signály s cílem podpořit vyžadované biochemické změny chromatinu a post-translační modifikace proteinů (Luciani *et al.*, 2006).

2.7.3.1 Struktura PML tělísek

PML NBs mění svůj vzhled podle potřeb buněčného jádra v závislosti na fázi cyklu a stavu buňky. Během mitózy NBs vymizí a tvoří v cytoplazmě buňky MAPPs (*Mitotic Accumulation of PML Protein*, mitotická akumulace proteinu PML) (Everett *et al.*, 2007). PML NBs z obvyklých bodových mikrosfér tvoří v interfázi také velké balónovité či barelovité struktury, které se v anglicky psané literatuře nazývají PML „doughnuts“ (nebo také „giant body“) (viz obr. 2-16), kdy PML je lokalizováno po obvodu tělesa a centrum je bez PML (Sternsdorf *et al.*, 1997). Bylo zjištěno, že jsou tato tělíska zahrnuta do remodelace chromatinu během fáze S a G2 (Luciani *et al.*, 2006). S centrální částí tělísek PML asociují proteiny: RecQ helikáza BLM (Bischof *et al.*, 2001), DAXX (), TOPO III, SUMO-1, HP-1 (*Heterochromatin Protein 1*, heterochromatinový protein 1), RAD51, CBP/p300 a NBS1 na přelomu S/G2 fáze bez poškození DNA (Luciani *et al.*, 2006). HDAC CBP/p300 interaguje také se všemi STAT proteiny, skrze níž jsou schopny ovlivňovat remodelaci chromatinu. Proteiny BRCA1 a γ H2AX (Carbone *et al.*, 2002), RAD51, RP-A a BLM asociují s tělísky PML po vzniku poškození DNA a společně tak představují možný komplexní rekombinozom pro opravu DSBs, které vznikají náhodně i indukovaně (Bischof *et al.*, 2001). Tělíska PML také asociují se satelity chromozomů 1 a 9 (Luciani *et al.*, 2006) a s proteiny B23 a Sp100, které jsou typické pro tělíska PML asociovaná s jadérky (Janderová-Rossmeislová *et al.*, 2007). V Ras-indukované buněčné senescenci byla objasněna úloha PML NBs při interakci s SAHF (viz 2.3.2.2). Varianta histonu H2 (makroH2A) je normálně rezistentní k chromatin-remodelujícím proteinům, mezi které patří HP1. Při SAHF dochází k umlčení transkripce, která je zprostředkována interakcí pro-senescentních histonových chaperonů HIRA (*Histone Regulator*, regulátor histonu) a ASF1a (*Anti-Silencing Factor 1a*, faktor 1a proti umlčování) s PML NBs (Zhang

et al., 2005a). S PML NBs po virové infekci také u myších buněk asociuje MxA (viz 2.6), což spolu s výše uvedenými skutečnostmi zakládá hypotézu, že PML NBs nejsou jen pasivní místa sekvestrace jaderných neaktivních proteinů, ale spíše aktivní místa zprostředkovávající opravu, replikaci i transkripci DNA.



Obrázek 2-16: Balónovitý typ jaderného tělíska PML. A) Snímek dvou jaderných PML NBs tvořících doughnuts (převzato z Janderová-Rossmeislová *et al.*, 2007). B) Transverzní řez teoretického modelu PML doughnut. C) Detail různých vrstev proteinů. Šipky znázorňují interakce protein-DNA, protein-protein, a SUMOylace (převzato a upraveno z Luciani *et al.*, 2006).

2.7.3.2 Regulace PML

Exprese PML je závislá na fázi buněčného cyklu. Nejvíce je PML indukován v G1-fázi (Chang *et al.*, 1995). Bylo popsáno několik mechanismů degradace PML. Jeden z nich probíhá skrze SUMO-isopeptidázu SENP-1, která odstraňuje SUMO-1 z PML a to vede k rozvolnění agregátu PML NBs (Park *et al.*, 2005). Druhý popsaný mechanismus degradace PML probíhá skrze SBD (*S*UMO *B*inding *D*omain, SUMO-vazebnou doménu), kde jsou serinové zbytky fosforylovány CK-2 (*C*asein *K*inase *2*, casein-kinázou 2) (Scaglioni *et al.*, 2006). Proteazomová degradace PML je realizována skrze ubiquitinylaci poly-SUMO řetězce pomocí poly-SUMO-specifické E3-ubiquitin ligázy SNURF (*S*mall *N*uclear *R*ING *F*inger protein, malý jaderný protein rozpoznávající prst RING, nebo také RNF4, *R*ING *F*inger protein 4) (Percherancier *et al.*, 2009).

2.7.4 Spojení PML NBs, interferonové dráhy a p53

Exprese PML je indukována IFNs (Chelbi-Alix *et al.*, 1995). Overexprese PML indukuje senescenci a apoptózu a inaktivace genu pro PML vede ke zrychlení buněčné proliferace a tím k tumorigenezi (Wang *et al.*, 1998a). Tyto vlastnosti předurčují PML roli nádorového supresoru.

PML jsou považovány za senzory poškození DNA, jejichž odpověď na DSBs je regulována NBS1 a kinázami ATM, CHK2 a ATR (Dellaire *et al.*, 2006). Bylo zjištěno, že po ozáření UV radiací, PML NBs zvyšují svůj počet a akumulaci proteinů. Formují takto nová mikrotělíška, která rostou z již existujících PML NBs díky jejich rozpadu pomocí supra-molekulárního poltivého mechanismu (Dellaire *et al.*, 2006). Signalizace poškození DNA může být regulována p53 a jeho akumulací v PML NBs. PML fyzikálně interaguje s p53 i pRb a tvoří tak další regulační element těchto drah, které jsou zásadní pro indukci senescence (viz 2.4) (Pearson *et al.*, 2001).

Přímé spojení indukce IFN od poškození DNA může být skrze Kap-1, jež je důležitý v interakci s HDAC a methyltransferázami, které inhibují transkripci. V případě aktivace Kap-1 kinázou ATM (viz 2.2.1.3.1.1) dojde ke zvýšení exprese IFN a STAT a jejich ISGs (IRF-1) (Kamitani *et al.*, 2008). IFNs typu I aktivují receptor pro IFN typu I (IFNAR1 a 2), který skrze rodinu Jak kináz aktivuje STAT1, STAT2 i STAT3. Signalizace IFN typu I vede k přednostní aktivaci heterodimerů STAT1-STAT2, jež jsou translokovány do jádra, kde spouští expresi IRF-9. Všechny tři proteiny se spojují do komplexu známého jako ISGF3 (shrnutí v Kröger *et al.*, 2002), a aktivují geny, jež mají v promotoru jak element ISRE, např. PML, IRF-1, MxA, i GAS element, např. PML, IRF-1 (Stadler *et al.*, 1995; Der *et al.*, 1998). Dalším možným faktorem aktivovaným IFN typu I je homodimerní komplex AAF (*IFN α -activated factor*, aktivace fosforylací na S727), který je schopen aktivovat transkripci pouze těch ISGs, jež mají ve svém promotoru element ISRE (PML, IRF-1, MxA) (shrnutí v Tassiulas *et al.*, 2004) (viz obr. 2-11).

IFNs typu II aktivují receptory pro IFNs typu II i I (IFNAGR1 a 2) a tím STAT1, který homodimerizuje se STAT1 za tvorby komplexu GAF (*IFN γ -activated factor*, aktivace fosforylací na Y701). Tento komplex má schopnost indukovat pouze expresi těch ISGs, jež mají v promotoru GAS element, např. PML, IRF-1 (Zhang *et al.*, 2006). IFN typu II mohou však ovlivňovat také ISGs, které nemají GAS element a to skrze indukci IRF-1, který aktivuje ISGs s elementem ISRE (Coccia *et al.*, 1995). Bylo také zjištěno, že exprese p21 je indukována přímo proteiny IRF-1 (Kröger *et al.*, 2002) i STAT1 (Liu *et al.*, 1998).

STAT3 je aktivován na Y705 v odpovědi na stimulaci IFN typu I a IL-6 (Yang *et al.*, 1996), a tvoří heterodimery se STAT1, které jsou schopny aktivovat geny s elementy ISRE a také GAS v promotoru (viz obr. 2-13).

IFN typu I zvyšuje hladinu p53 u kultur myších a lidských buněk skrze transkripční aktivaci elementu ISRE, který je na jeho promotoru (Takaoka *et al.*, 2003). PML je

potenciální transkripční cíl p53, protože má v promotoru jeden p53-responzivní element (Stanchina *et al.*, 2004). Protein p53 není konstitutivně asociován s PML NBs, je rekrutován k transientní asociaci s PML NBs po aktivaci onkogenu Ras (Ferbeyre *et al.*, 2000), expozici UV nebo ionizujícímu záření (Carbone *et al.*, 2002), infekci virů (Pampin *et al.*, 2006) a exogenní expresi PML-IV (Fogal *et al.*, 2000). Bylo zjištěno, že některé z izoform PML jsou indukovány v odpovědi na IFN u buněk linií MCF-7 a U-2-OS a nejsou schopny vázat p53 do PML NBs. Protein p53 je SUMOylován na K382, ale tato modifikace není pro interakci s PML nezbytná. V PML NBs byly nalezeny mnohé regulátory p53, některé z nich také podstupují SUMOylace, např.: CBP/p300 (SUMOylován), jež interaguje také se STAT1, dále HDM2 (SUMOylován), SIRT1 (*SIR*tuin *Type 1*), CHK2 a specifická ubiquitin-proteáza asociovaná s Herpes virem HAUSP (*Herpes-virus Associated Ubiquitin Specific Protease*) (shrnutí v Everett *et Chelbi-Alix*, 2007).

PML NBs umožňují interakci CHK2 a p53, která vede k prodloužení aktivační fosforylace p53 na S20 a tím k nemožnosti degradace skrze ubiquitin-ligázu HDM2 (Louria-Hayon *et al.*, 2003). Tímto PML NBs ovlivňují aktivaci apoptózy a p53-dependentní senescence. Byl popsán i reciproký vztah, kdy PML aktivuje CHK2 v odpovědi na poškození DNA (Dellaire *et Bazett-Jones*, 2007). Další interakcí mezi PML NBs a p53 je zprostředkování aktivační fosforylace p53 na S46 kinázou HIPK2 (*Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2*, *proteinová kináza 2 interagující s homoedoménu*), který je rekrutována do PML NBs (Hofmann *et al.*, 2002). Tato aktivace stabilizuje p53 a umožňuje další stabilizační modifikaci, acetylaci p53 na K382 skrze histon-acetylázu CBP/p300, která je také rekrutována do PML NBs a interaguje se STAT1 (Pearson *et al.*, 2000).

3 Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce, která je rovněž součástí grantu GAČR Úloha Jak/STAT signalizace v buněčné senescenci, je charakterizovat předčasnou senescenci vyvolanou tymidinem a úlohu signální dráhy Jak/STAT v tomto typu chemicky indukované senescence.

Dílčí cíle:

- I. Charakterizovat tymidinem indukovanou senescenci s bližším zaměřením na expresi nádorového supresoru PML, jednoho z markeru buněčné senescence.
- II. Charakterizovat aktivitu interferonové signální dráhy v tymidinem indukované senescenci

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Materiál a Chemikálie

Ústav molekulární genetiky AV ČR v.v.i.

EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*, kyselina etylendiaminotetraoctová), DD H₂O (redestilovaná sterilní voda), Médium DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), L-glutamin, 10x PBS (*Phosphate Buffered Saline*, fosfátový solný pufr), NaHCO₃, trypsin

Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.

Inhibitor RNáz, SYBRGreen PCR master mix, TaqMan reverse transcription reagent, Multiscribe reverse transcriptase

Bio-Rad Laboratories, Hercules, U.S.A.

Ponceau S

Fermentas International Inc., Burlington, U.S.A.

PageRuler prestained protein ladder

Fluka, Švýcarsko

TEMED (*N,N,N',N'-TetraMethylEthylenDiamine*; *N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin*), Triton X-100, Tween20, dithiotreitol, X-Gal (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid*), Tris, 2-propanol

Gibco/Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.

Geneticin sulfát (G418)

Hoechst, Frankfurt am Main, Německo

Mowiol 4-88

Kodak, U.S.A

Rentgenový film MXB

LEK Pharmaceuticals d.d., Ljubljana, Slovinsko

Gentamicin

PAA Laboratories Inc., U.S.A.

FBS (*Foetal Bovine Serum*, fetální kravské sérum)

Pall Corporation, New York, U.S.A.

Nitrocelulózová membrána

Penta, Praha, Česká republika

Etanol 96%, isopropanol, glycerol, hexakynoželesnatan tetradraselný trihydrát, HCl, butanol

Pierce, Rockford, IL, U.S.A.

Kit na měření koncentrace proteinů: BCA (*BiCinchoninic acid Assay*)

Pliva – Lachema a.s., Brno, Česká republika

Bromfenolová modř, paraformaldehyd

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo

Inhibitory proteáz a fosfatáz COMPLETE

Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo

Akrylamid/Bis 30% (29:1), chloroform, SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate, dodecylsulfát sodný*), Triton X-100

Sigma Aldrich, St. Louis, U.S.A.

Afidikolin, azid sodný, BSA (*Bovine Serum Albumin, hovězí sérový albumin*), BrdU (*BRomoDeoxyUridine, 5'-bromo-2'-deoxyuridin*), 96% etanol, DAPI (*4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole, 4',6-diamidino-2-fenylindol*), DMSO (*DiMethylSulphOxide, dimetylsulfoxid*), distamycin A, doxorubicin hydrochlorid, doxycyklin hydrochlorid, etoposid, glutaraldehyd, hydroxymočovina, luminol, kamptotecin, peroxid vodíku (30%), APS (*Ammonium Persulphate, persulfát amonný*), TMD (*ThyMiDine, tymidin*), Tri-Reagent

Thermo Fischer Scientific Inc., Švédsko

SuperSignal West Substrates Trial Kit (substráty pro ECL)

4.1.2 Použité protilátky

Tabulka 4-1: Primární protilátky.

Název protilátky	Host	Koncentrace (µg/ml)	Metoda	Zdroj
anti-GAPDH (klon 6C5)	Myš	0,1	IB	Applied Biosystems, Foster City, U.S.A
anti-fosfo-p53 (lon S15)	Králík	0,1	IB	Cell Signalling Technology Inc., Denvers, U.S.A.
anti-fosfo-STAT1 (Y701)	Králík	0,1	IB	
anti-fosfo-STAT3 (Y705) (klon 3E2)	Myš	0,1	IB	
anti-STAT1 (klon SM1)	Myš	0,1	IB	Exbio, Vestec, Česká republika
anti-fosfo-STAT1 (S727) (klon PSM1)	Myš	0,05	IB	
anti-fosfo-H2A.X (S139) (klon JBW301)	Myš	0,05	IF, IB	Millipore Corp., U.S.A
anti-53BP1 (klon H-300)	Králík	1	IF	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A.
anti-IRF-1 (klon M-20)	Králík	0,05	IF, IB	
anti-p16 (klon H-156)	Králík	0,1	IB	
anti-PML (klon PG-M3)	Myš	0,01	IF	
anti-PML (klon H-238)	Králík	0,05	IB	
anti-STAT3 (klon C-20)	Králík	0,05	IB	
anti-p21	Myš	0,05	IB	Dr. Zdeněk Hodný
anti-p53	Králík	0,1	IB	prof. Bořek Vojtěšek
anti-MxA	Myš	0,01	IF	prof. Jiří Bártek
anti-Nup98	Koza	0,5	IF	doc. Jitka Forstová
anti-Nup153	Myš	0,1	IF	

Tabulka 4-2: Sekundární protilátky.

<i>Název protilátky</i>	<i>Host</i>	<i>Koncentrace</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Metoda</i>	<i>Zdroj</i>
anti-myší Alexa Fluor 488	koza	2	IF	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, U.S.A.
anti-králičí Alexa Fluor 568	koza	2	IF	
anti-králičí Alexa Fluor 488	koza	2	IF	
anti-myší Alexa Fluor 568	koza	2	IF	
anti-kozí Alexa Fluor 594	osel	2	IF	
anti-myší Cy3	osel	40	IF	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, U.S.A.
anit-myší kozí sérum konjugované se peroxidázou	koza	0,2	IB	Bio-Rad Laboratories, Hercules, U.S.A.
anit-králičí kozí sérum konjugované se peroxidázou	koza	0,2	IB	

4.1.3 Přístrojové vybavení

Automatické mikropipety

Labmate HTL

Centrifugy

Centrifuga 5415R Eppendorf (Hamburg, Německo), Minicentrifuga Hermle 2100M (U.S.A)

Bürkerova komůrka

Fuchs-Rosenthal, Laboroptik (Friedrichsdorf, Německo)

Inkubátor (CO₂)

Angelantoni, Itálie

Laminární box

Jouan, France

PCR termocykler

Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research, Minnesota, U.S.A)

Ab 7300 Prism Real Time PCR Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A)

Spektrofotometr

NanoDrop ND-1000, Original Multiskan EX (Thermo Fischer Scientific Inc., Švédsko)

Přístroj na elektrický transfer proteinů (IB, *ImunoBlot*, *imunoblot*)

Wet blot (Enduro Power Supplies Labnet International Inc., New York, U.S.A)

Ostatní

vortex Genie 2 (Scientific Industries, New York, U.S.A.), vodní lázeň Grant (Praha, ČR), automatický vyvolávač rentgenových filmů Fomei (ČR)

Vertikální elektroforéza

Mini-Protean (Bio-Rad Laboratories, Hercules, U.S.A.)

4.2 Metody

4.2.1 Tkáňové kultury

4.2.1.1 Buněčné linie

A549

A549 je stabilní nádorová buněčná linie původem z plicního karcinomu. Pro experimenty byla získána od dr. Petera Šeba (MBÚ, AV ČR). Kultivace tkáňových kultur A549 probíhala v DMEM médiu s obsahem 10% FBS. Doba populačního zdvojení je přibližně 22 hodin. Identifikační kód v databázi ATCC (*American Type Culture Collection*) je CCL-185.

HeLa kmen I (HeLa I)

Tato stabilní nádorová linie původem z karcinomu děložního čípku byla získána od prof. Pavla Hozáka (ÚMG, AV ČR). Kultivace tkáňových kultur A549 probíhala v DMEM médiu s obsahem 10% FBS. Doba populačního zdvojení je přibližně 24 hodin. Identifikační kód v databázi ATCC je CCL-2.

HeLa kmen II (HeLa II)

Linie HeLa kmene I kultivována v médiu DMEM s 5% obsahem FBS.

U-2-Os

Tato nádorová linie fibroblastových byla získána od prof. Jiřího Bártka (Institute of Cancer Biology, Copenhagen, Dánsko). Buňky byly kultivovány v médiu DMEM obsahujícím 10% FBS. Identifikační kód v databázi ATCC je HTB-96.

U-2-Os p53DD

Linie buněk U-2-Os p53DD je stabilně transfekovaná pro expresi dominantně negativní (DN) formy jako deleční mutanty proteinu p53 (Sörrensen *et al.*, 2000; Mailand *et al.*, 2000) a byla získána od prof. Jiřího Bártka. Buňky byly kultivovány v médiu DMEM obsahujícím 10% FBS s přidavkem puromycinu (1 µg/ml), G418 (400 µg/ml) a doxycyklinu (2 µg/ml).

4.2.1.2 Příprava médií

Tabulka 4-3: Příprava kultivačního média DMEM.

Složení	Objem (ml)
DMEM 2x	250
L-glutamin (200 mM)	10
NaHCO ₃ 7.5%	10
Gentamicin (4 mg/ml)	5
FBS	50
d. H ₂ O	175
Výsledný objem:	500

4.2.1.3 Kultivace tkáňových kultur

Tkáňové kultury byly kultivovány v plastových nádobách určených pro adherentní tkáňové kultury. Buňky byly stabilně udržovány v 95% vlhkosti, 5% CO₂, tmě a teplotě 37 °C. Denně byly kontrolovány podle barvy média, buněčné morfologie a denzity. Při dosažení 95% konfluency byly buňky přeneseny pomocí 0,06% roztoku trypsinu/EDTA do nové misky s čerstvým médiem.

Pro dlouhodobé uchovávání bylo 1×10^6 buněk/ml resuspendováno v zamrazovacím médiu obsahujícím 90% FBS a 10% DMSO a po 24 hodinách při -80°C byly ampule s buňkami přeneseny do tekutého dusíku.

Pro imunofluorescenční analýzu byly buňky kultivovány v 6-jamkových deskách (1 jamka/9,6 cm²) na 10 mm sterilních krycích sklíčkách. Lyzáty z buněk narostlých na 6 cm Petriho miskách (25 cm²) byly použity pro imunoblot. Obvyklé počáteční množství buněk nasazovaných pro přípravu buněčných lyzátů nebo pro imunofluorescenční analýzu bylo 20 000 buněk/cm². Pro izolaci RNA bylo nasazováno 15 000 buněk/cm².

Pro každý experiment byly buňky v 80% konfluenci vystaveny po určitou dobu různým koncentracím genotoxických látek (viz tabulka 4-4). Koncentrace a doba působení těchto látek byla stanovena experimentálně a s přihlédnutím k dostupné literatuře.

Tabulka 4-4: Genotoxické látky aplikované na buňky

Metoda	Genotoxické látky				Reference
	Název	Koncentrace	Rozpouštědlo	Buněčné linie	
Detekce SA- β -gal	BrdU	100 μ M	voda	HeLa II, A549, U-2-Os p53DD	Jandrová-Rossmeislová <i>et al.</i> , 2007
	hydroxy-močovina	150 μ M	voda	HeLa I, II	Yeo <i>et al.</i> , 2000
	tymidin	2,5 mM	voda	HeLa II, U-2-Os p53DD, A549	Engstrom <i>et al.</i> , 2007
Imunofluorescenční detekce	afidikolin	0,3 μ M	DMSO	HeLa II	Dhillon <i>et al.</i> , 2003
	BrdU	100 μ M	voda	HeLa II	Jandrová-Rossmeislová <i>et al.</i> , 2007
	distamycin A	10 μ M	DMSO	HeLa II	Chandra <i>et al.</i> , 1970
	kamptotecin	0,25 μ M	metanol	HeLa II	Rothenberg M.L., 1997
	cisplatina	1 μ M	voda	HeLa II	Gonzalez <i>et al.</i> , 2001
	etoposid	10 μ M	voda	HeLa II	Caldecott <i>et al.</i> , 1990
	hydroxy-močovina	150 μ M	voda	A549	Yeo <i>et al.</i> , 2000
	tymidin	2,5 mM	voda	U-2-Os p53DD, A549	Engstrom <i>et al.</i> , 2007
Imunoblot	tymidin	2,5 mM	voda	U-2-Os p53DD, A549	Engstrom <i>et al.</i> , 2007
qReal Time PCR	tymidin	2,5 mM	voda	U-2-Os p53DD, A549	Engstrom <i>et al.</i> , 2007

4.2.2 Detekce exprese β -galaktosidázy

Tato metoda je založena na detekci β -galaktosidázy, jejíž aktivita je zvýšena u senescentních buněk. Buňky byly kultivovány v přítomnosti různých genotoxických látek na 10 mm krycích sklíčkách do 80% konfluence (viz Tabulka 1-4), poté byly dvakrát promyty PBS (37°C) a fixovány 0.5% roztokem glutaraldehydu v PBS při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Následovalo intenzivní promytí PBS a inkubace při 37°C v předehřátém substrátovém roztoku X-Gal (složení viz tabulka 4-5) (Dimri *et al.*, 1995).

Inkubace při 37°C probíhala dokud nebylo evidentní modré zbarvení indikující aktivitu β -galaktosidázy, obvykle 3 - 12 hodin. Krycí sklíčka byla poté přichycena 3 μ l montovacího média Mowiol na podložní sklíčko. Buňky byly pozorovány po fluorescenčním mikroskopem Leica DM 6000B. Všechny obrázky byly snímány digitální barevnou kamerou DFC 450 FX. Množství buněk pozitivních na aktivitu β -galaktosidázy bylo spočítáno z 10 náhodných zorných polí ve dvou nezávislých experimentech.

1x PBS: 140 mmol/l NaCl, 3 mmol/l KCl, 16 mmol/l Na₂HPO₄, 2 mmol/l KH₂PO₄, pH 7.4

Tabulka 4-5: Složení roztoku X-Gal.

<i>Složka</i>	<i>Objem</i>
X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (zásobní roztok = 40 mg/ml N,N-dimethylformamidu)	0.25 ml
pH 6.0 hexakynoželezitan draselný (výsledná koncentrace 0.12 mmol/l)	0.56 ml
pH 6.0 hexakynoželezitan draselný (výsledná koncentrace 0.12 mmol/l)	
PBS + 1 mmol/l MgCl ₂	9.3 ml
Výsledný objem:	10 ml

4.2.3 Nepřímé imunofluorescenční značení

Principem této metody je detekce buněčných složek (protein, DNA) pomocí reakce antigen-protilátka. Specifická primární protilátka je vizualizována pomocí fluorescenčně značené sekundární protilátky. Buňky byly kultivovány na 10 mm krycích sklíčkách v přítomnosti různých chemikálií (viz tabulka 4-4). Poté bylo medium odsáto, sklíčka promyta roztokem PBS, buňky fixovány po dobu 15 minut v 4% roztoku formaldehydu v PBS s následnou permeabilizací pomocí 0.2% roztoku Triton X-100 v PBS po dobu dalších 15 minut. Permeabilizované buňky byly intenzivně promyty roztokem PBS a blokovány 10% roztokem FBS/PBS po dobu 1 hodiny. Poté následovala inkubace s primární protilátkou ředěnou v 10% roztoku FBS/PBS po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě nebo přes noc při 4°C (viz tabulka 4-1). Po důkladném promytí pomocí PBS byly buňky inkubovány se sekundární protilátkou ředěnou opět v 10% roztoku FBS/PBS po dobu 1 hodiny (viz tabulka 4-2), následovalo intenzivní promytí roztokem PBS. Krycí sklíčka s buňkami byla po promytí v DD H₂O usušena a pak zamontována 3 μ l roztoku Mowiol obsahujícím interkalační barvivo DAPI (0,8 μ g/ml) na podložní sklíčka. Buňky byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem Leica DM 6000B s černobílou digitální kamerou DFC 350 FX nebo pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu Leica DM 6000 s konfokálním nástavcem Leica TCS Sp5 AOBS Tandem (excitační vlnové délky 405, 488, 561 a 633 nm). Jako negativní kontrola byla použita stejná kultura buněk bez působení genotoxických látek.

4.2.4 Immunoblot

4.2.4.1 Příprava buněčných lysátů

Buňky byly kultivovány na 6-jamkových miskách do 90% konfluency v přítomnosti různých genotoxických látek (viz tabulka 4-4). Po intenzivním promytí roztokem PBS byly buňky lyzovány 100 μ l roztoku SLB (vzorkový Laemmliho pufr) s inhibitory proteáz a fosfatáz. Lyzované buňky byly mechanicky seškrábány speciální tyčinkou a přeneseny do

mikrozkumavky. Dále byly sonikovány 2 x 15s při amplitudě 2–3 mikrony pro fragmentaci DNA. Lyzát byl následně centrifugován (15 000 g, 20°C, 2 minuty) a uložen do -80°C.

4x pufr SLB naředěný s H₂O v poměru 1:3 : 250 mmol/l Tris-HCl pH 6.8, 40% (w/v) glycerol, 8% (w/v) SDS

4.2.4.2 Stanovení koncentrace proteinů

Ke stanovení koncentrace proteinů byl použit kit Bicinchoninic acid assay od firmy Pierce (U.S.A.). Tato metoda je založena na redukci iontů Cu²⁺ síranu měďnatého na Cu⁺ peptidovou vazbou při 37°C (biuretová reakce). Následně jsou Cu⁺ ionty v alkalickém prostředí (pH 11.25) vázány kyselinou bicinchoninovou za tvorby ve vodě rozpustného fialového komplexu s absorpčním maximem při 562 nm.

Roztok A: 2% (w/v) Na₂CO₃.H₂O, 0,95% (w/v) NaHCO₃, 0,16% (w/v) vinan sodný, 0,4% (w/v) NaOH, 1% sodná sůl kyseliny bicinchoninové, pH 11.25

Roztok B: 4% (w/v) CuSO₄.5H₂O

Zásobní roztok BSA: 2.0 mg/ml

Kalibrační křivka byla vytvořena podle instrukcí v kitu ředěním zásobního roztoku BSA v destilované vodě na koncentrace v rozmezí od 20 µg/ml do 2 000 µg/ml. Koncentrace proteinu byla stanovována v 96-jamkových destičkách. Každý vzorek byl naředěn 5x destilovanou vodou na výsledný objem 10 µl. K naředěnému vzorku bylo přidáno 200 µl roztoku A a 4 µl roztoku B (viz výše). Inkubace probíhala 30 minut při 37°C a poté byla stanovena hodnota absorbance při 562 nm. Koncentrace proteinů ve vzorku byla určena podle kalibrační křivky. Vzorky pro polyakrylamidovou elektroforézu (SDS-PAGE) byly následně naředěny na koncentraci 35 µg/ml 4 x SLB pufrům.

4.2.4.3 Denaturující polyakrylamidová gelová elektroforéza

V této metodě se využívá separace molekul proteinů v elektrickém poli. Proteinům je udělen uniformní náboj prostřednictvím SDS, díky čemuž je jejich migrace ovlivněna hlavně molekulovou hmotností.

4x pufr SLB: 250 mmol/l Tris-HCl pH 6.8, 40% (w/v) glycerol, 8% (w/v) SDS, 0,4% β-merkaptóetanol, 0,01% bromfenol

Pufr A: 1.5 mol/l Tris-HCl pH 8.8, 0.4% (w/v) SDS

Polymerizační roztok: 30% (w/v) akrylamid, 0.8% (w/v) BIS/akrylamid

Pufr B: 0.5 mol/l Tris-HCl pH 6.8, 0.4% (w/v) SDS

Elektroforetický pufr: 25 mmol/l Tris, 188 mmol/l glycin, 0.1% (w/v) SDS

Tabulka 4-6: Složení gelu pro proteinovou elektroforézu.

<i>Složka</i>	<i>Separační gel</i>	<i>Zaostřovací gel</i>
(%)	10	4
d.H ₂ O	4.0 ml	2.7 ml
pufr A	2.6 ml	0 ml
pufr B	0 ml	0.54 ml
Polymerizační roztok	3.3 ml	0.67 ml
10% APS	0.1 ml	40 µl
TEMED	10 µl	4 µl
Výsledný objem	10 ml	4 ml

Složky gelu byly smíchány a roztok byl napipetován mezi dvě skla se s postranními zářázkami, které byly umístěny do stojanu. Po převrstvení vodou nasycenou butanolem gel polymerizoval při pokojové teplotě 30 minut. Voda byla odstraněna, mezi skla byl napipetován polymerizační roztok B a umístěn hřebínek pro tvorbu jamek. Po 15 minutách došlo při pokojové teplotě ke zpolymerování gelu. Poté byl hřebínek vyjmut a skla s gelem umístěna do elektroforetické aparatury, kde byla zalita elektrodovým pufrem.

Proteinové vzorky byly rozmrazeny a inkubovány při 99°C po dobu 4 minut. Vzorky (po 15 µl) a marker molekulových hmotností (5 µl) byly napipetovány do jamek v polyakrylamidovém gelu. Elektroforéza byla připojena na zdroj napětí. Program na zdroji byl nastaven do dvou kroků: 50 V po dobu 30 minut a 210 V do doby, kdy barva ve vzorcích dosáhla spodního konce gelu.

4.2.4.4 Imunoblot a detekce

Imunoblot je metoda přenosu proteinů z gelu na speciální membránu pomocí elektrického pole. Proteiny byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu technikou mokrého typu imunoblotu. Pro detekce proteinů na membráně byly použity neznačené primární a křenovou peroxidázou značené sekundární protilátky (viz tabulky 4-1 a 4-2). Imunoreaktivní signál byl detekován otiskem na rentgenový film.

Transferový pufr: 25 mmol/l Tris, 192 mmol/l glycin, 20% (v/v) methanol; pH 8.3

PBS/0.05% Tween20 (PBS-T): 134 mmol/l NaCl, 1.8 mmol/l Na₂HPO₄; pH 7.2, 0.05% (w/v) Tween20

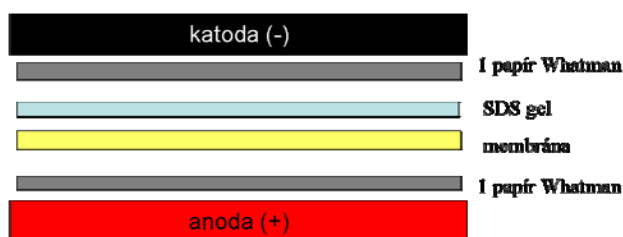
Blokovací roztok: 5% (w/v) odtučněné sušené mléko rozpuštěné v PBS/0.1% Tween20

Barvící a odbarvovací lázeň: Ponceau S a PBS/0.1% Tween20

Chemiluminiscenční roztok A: 22.5 mg Luminolu v 0.5 ml DMSO, 50 ml Tris pH 8.8, 220 μ l 90 mmol/l kumarová kyselina v DMSO

Chemiluminiscenční roztok B: 30.6 μ l 30% (w/v) peroxid vodíku, 50 ml 0.1 mol/l Tris pH 8.8

Po proběhnutí elektroforézy byl gel ekvilibrován 5 minut v transferovém pufru. Nitrocelulosaová membrána a dva hrubé filtrační papíry o velikosti gelu byly také ekvilibrovány 2 minuty v transferovém pufru. Všechny komponenty byly poskládány na sebe (viz obr. 4-2) a vloženy v kazetě do blotovací aparatury. Na zdroji bylo nastaveno napětí 4 mA na cm^2 membrány po dobu 2 hodin.



Obrázek 4-1: Schéma složení blotovací aparatury.

Po dokončení transferu byla ověřena úspěšnost tohoto kroku pomocí barvicího roztoku Ponceau S. Následně byla membrána inkubována 30 minut s blokovacím roztokem a poté s primární protilátkou. Požadované množství primární protilátky bylo naředěno v 5 ml roztoku obsahujícího 1-5% mléka rozpuštěného v 0.05% Tween20/PBS (PBS-T). Membrána byla inkubována s tímto roztokem za neustálého třepání. Následovalo důkladné promytí membrány v PBS-T a inkubace se sekundární protilátkou ředěnou do 3% mléka rozpuštěného v PBS-T. Po jedné hodině inkubace byla membrána opět intenzivně promyta PBS-T.

Pro detekci navázané sekundární protilátky byl smíchán chemiluminiscenční roztok A s chemiluminiscenčním roztok B v poměru 1:1. Inkubace membrány v tomto roztoku probíhala po dobu 5 minut. Poté byla membrána vysušena filtračním papírem a uložena s rentgenovým filmem do vyvolávací kazety. Vyvolání filmu bylo provedeno na automatické aparatuře Kodak.

4.2.5 Kvantitativní Real Time polymerázová řetězcová reakce

Polymerázová řetězcová reakce (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) je metoda, která umožňuje exponenciální amplifikaci krátkých sekvencí DNA umístěných v dlouhé molekule dsDNA. Metoda koordinuje cyklické změny teploty, jako jsou opakované zahřívání a chlazení pro tání DNA a enzymatickou amplifikaci. Primery jsou krátké

sekvence komplementární k cílové části DNA určené pro amplifikaci. DNA polymeráza je klíčová komponenta schopná selektivně a opakovaně amplifikovat sekvence DNA. Během průběhu reakce je generována nová DNA a zároveň použita jako templát pro další amplifikační reakci, což vede k exponenciálnímu nárůstu ampliconů.

Jednou z modifikací PCR je kvantitativní PCR (*quantitative Real Time PCR*) v reálném čase, což je metoda pro kvantifikaci relativního i totálního množství aktuálně generovaných ampliconů během jedné reakce, které reprezentují genovou expresi. Princip metody je založen na měření fluorescence k určení hranice cyklu (*Cycle threshold, Ct*) během PCR, když hladina fluorescence poskytuje signál a je lineární částí amplifikační křivky.

V této diplomové práci byl použit systém detekce interkalátoru DNA známý jako metoda SYBR Green, v níž je využívána fluoreskující molekula SYBR Green, která se váže do nově syntetizovaných molekul dsDNA.

4.2.5.1 Izolace totální RNA

Buňky byly nasazeny na 6-jamkovou misku a v 90% konfluenci ošetřeny různými genotoxickými látkami (viz tabulka 4-4). Poté byly buňky bez oplachu lyzovány 1 ml fenolového roztoku Tri-Reagent spolu s působením střížných sil při opakovaném nasávání mikropipetou. Lyzáty byly přeneseny do zkumavky a ponechány v laboratorní teplotě (*Room Temperature, RT*) 5 minut.

Pro izolaci RNA bylo k lyzátu přidáno 200 μ l vychlazeného chloroformu, lyzát byl promíchán každých 20 s po dobu 6 minut a hned centrifugován (15 000 g, 4°C, 15 minut). Vzorek byl po centrifugaci rozdělen do tří fází. Spodní fáze obsahovala proteiny, interfáze DNA a horní vodná fáze RNA. Tato horní fáze byla opatrně přenesena do nové zkumavky, bylo přidáno 500 μ l vychlazeného izopropanolu a po promíchání ponecháno při RT 5 minut. Poté byly opět vzorky centrifugovány (15 000 g, 4°C a 10 minut). Supernatant byl odstraněn a k peletě bylo přidán 1 ml 75% (v/v) etanolu. Po promíchání byly vzorky opět centrifugovány (4 500 g, 4°C, 5 minut). Pak byly po odstranění supernatantu pelety RNA vysušeny 5-10 min při RT. Pelety byly rozpuštěny v 30 μ l vody při 58°C 10 minut. Koncentrace RNA byla měřena pomocí spektrofotometru NanoDrop. Hodnota absorbance 260/280 představující čistotu RNA vzorků odpovídala rozmezí 1,94 – 2,02.

4.2.5.2 Reverzně transkripční PCR

Po izolaci totální RNA byla provedena RT PCR (*Reverse Transcription PCR*) za účelem přepisu mRNA do cDNA a její amplifikace. Totální RNA byla nejdříve naředěna na koncentraci 100 ng/μl a poté přidána k PCR master-mixu pro RT. Do každé PCR zkumavky bylo vloženo 8 μl master-mixu a 2 μl naředěné RNA (viz tabulka 4-7). Tato RNA byla přepsána s použitím náhodných hexamerů jako primerů.

Tabulka 4-7: Master-mix pro reverzní transkripci.

<i>Složka</i>	<i>Počet reakcí</i>	
	<i>1x (μl)</i>	<i>15x (μl)</i>
TaqMan Reverse Transcription Reagent	5,7	85,5
DD H ₂ O	1,85	27,75
Inhibitor RNáz	0,2	3
Reverzní transkriptáza TaqMan	0,25	3,75
RNA (100 ng/μl)	2	30
Celkový objem	10 μl	150 μl

RT PCR byla provedena s použitím termocykleru Peltier Thermal Cycler (MJ Reaserch) podle nastavení uvedeném v tabulce 4-8.

Tabulka 4-8: Program řídící RT PCR.

<i>Program</i>	<i>Teplota</i>	<i>Čas</i>
krok 1	25°C	10 min
krok 2	48°C	30 min
krok 3	95°C	5 min
krok 4	4°C	do konce

4.2.5.3 qRT PCR

Po reverzní transkripci získaná cDNA odpovídající 200 ng totální RNA byla naředěna na finální koncentraci 5 ng/μl. Master-mix o obsahu: SYBR Green, Taq Polymerázu, ROX, pufr a dNTPs; dále dH₂O a specifické primery (viz tabulka 4-9) byly smíchány a roztok rozdělen po 20 μl do 96-jamkové destičky. K němu bylo do každé jamky přidáno 5 μl cDNA (viz tabulka 4-10). Každý vzorek byl měřen v duplikátech a jako kontrola kontaminace byl použit master-mix bez cDNA. Destička se vzorky RNA byla krátce centrifugována. qRT PCR byla provedena použitím přístroje ABI Prism 7300 podle doporučení v manuálu (viz tabulka 4-11) s přidáním disociační křivky k potvrzení specifity amplifikovaných produktů.

Tabulka 4-9: Seznam použitých oligonukleotidů jako primerů.

<i>Gen</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
PML	5'-CCGCAAGACCAACAACATCTT-3'	5'-CAGCGGCTTGGAACATCCT-3'
IRF-1	5'-CTGGCACATCCCAGTGGAA-3'	5'-CATCCTCATCTGTTGTAGCTTCAGA-3'
MxA	5'-CTC CCA CTC CCT GAA ATC TG-3'	5'-GAG CTG TTC TCC TGC ACC TC-3'
GAPDH	5'-GTCGGAGTCAACGGATTGG-3'	5'-AAAAGCAG CCCTGGTGACC-3'

Tabulka 4-10: Real time PCR master-mix pro jeden gen.

<i>Složka</i>	<i>Počet reakcí</i>	
	1x (μl)	15x (μl)
templátová cDNA	5	75
Master Mix (SYBR Green PCR Master Mix, ABI)	12,5	187,5
Primery (2.5 μM, forward + reverse)	2,5	37,5
dd.H ₂ O	5	75
Celkový objem	25	375

Tabulka 4-11: Program reakce qRT PCR.

<i>Stupeň</i>	<i>Teplota</i>	<i>Čas</i>	<i>Opakování</i>
1	50°C	2:00	1
2	95°C	10:00	1
3	95°C	0:15	40
4	60°C	1:00	1
	95°C	0:15	
	60°C	0:30	
	95°C	0:15	
5	4°C	for ever	--

Po doběhnutí reakci byla získána data Ct, která reprezentovala kvantifikaci produktů. Tyto hodnoty byly analyzovány komparativní Ct metodou ($\Delta\Delta C_t$). Tato metoda umožňuje relativní kvantifikaci genové exprese bez potřeby standardní křivky tvořené cílovými geny a referenční kontrolou, kterým byl „housekeeping“ gen GAPDH.

Detailní matematické vysvětlení metody $\Delta\Delta C_t$ je skrze proporční vztah mezi hraničním cyklem (C_t) a originální úrovní genové exprese a dvojnásobné množství produktu v každém cyklu. Původní hladina exprese (L) každého genu je vyjádřena jako $L = 2^{-C_t}$. K normalizaci hladiny exprese genu (např. MxA) oproti housekeeping genu (GAPDH) byla hladina exprese rozdělena podle:

$$\frac{2^{-C_t(\text{MxA})}}{2^{-C_t(\text{GAPDH})}} = 2^{-[C_t(\text{MxA}) - C_t(\text{GAPDH})]} = 2^{-\Delta C_t}$$

K určení změny v genové expresi MxA je normalizovaná exprese genu (except) v experimentálním vzorku dělena expresí stejného ale normalizovaného genu (control):

$$\frac{2^{-C_t(\text{except})}}{2^{-C_t(\text{control})}} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

kde $\Delta\Delta C_t$ je rovno $\Delta C_t(\text{except}) - \Delta C_t(\text{control})$.

Výsledky

4.3 Tymidin indukuje předčasnou buněčnou senescenci a expresi SA- β -galaktosidázy

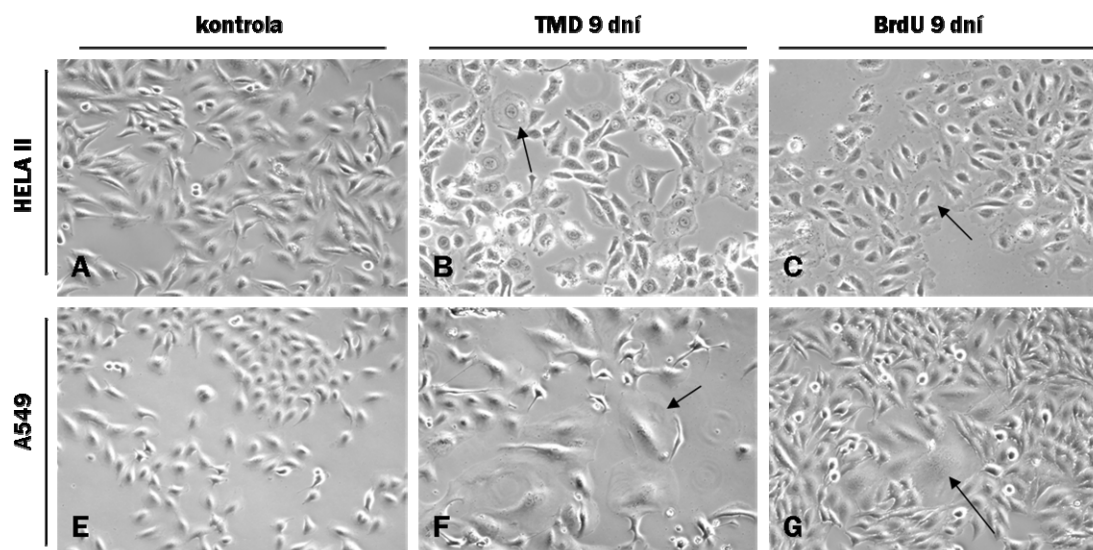
Tymidin (ThyMiDine, TMD) je jeden ze čtyř nukleosidů, z nichž je tvořena DNA. V koncentraci vyšší, než je buňce vlastní, působí změnou poměru deoxynukleotid-trifosfátů (dNTPs), konkrétně zvýšením hladiny buněčného dTTP. To má za následek inhibici ribonukleotid reduktázy, která katalyzuje formaci prekurzorů DNA. Buňka nemůže syntetizovat tyto prekurzory a díky tomu zastavuje buněčný cyklus před zahájením replikace DNA na přelomu fází G1 a S.

Při experimentech cílených na indukci oprav DNA u synchronizovaných buněk v S-fázi bylo mimo jiné zjištěno, že 2 mM TMD po jednodenním působení, vymytí a po následujícím třídenním působení vyvolává u buněk karcinomu tlustého střeva (DLD-1) morfologické změny spojené s buněčnou senescencí ([Engstrom et Kmiec, 2007](#)). Zajímalo nás, zda TMD vyvolá podobné změny morfologie buněk bez jednodenního předpůsobení pouze po kontinuálním působení.

Pro ověření, zda dlouhodobé působení TMD vyvolá také u kontinuálně proliferujících linií karcinomu plic (A549) a děložního čípku (HeLa) trvalou zástavu buněčného cyklu nebo eliminaci buněk apoptózou, vystavili jsme tyto buňky dlouhodobému působení 2,5 mM tymidinu (9 dní).

Jako kontrolní indukce zástavy buněčného cyklu byla použita kombinace látek analoga tymidinu 5'-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) s antibiotikem distamycinem A ([Janderová-Rossmeislová et al., 2007](#); [Michishita et al., 2002](#)). Díky nedostupnosti distamycinu A nastálé v průběhu práce na DP bylo nutné omezit indukci kontrolní senescence pouze na samotný BrdU, který byl podán ve zvýšené koncentraci. Efekt této látky na buněčnou senescenci byl prokázán již dříve ([Michishita et al., 2002](#); [Nováková Z., manuskript v revizi](#)).

Buňky byly nasazeny v počtu 25 000 buněk/cm², za 24 hodin bylo živné medium vyměněno a přidán 2,5 mM tymidin (TMD) a do paralelní kultivační misky 100 μ M BrdU. Pro zhodnocení efektu látek na indukci morfologických změn byly po 9 dní buňky na miskách sledovány pod fázovým kontrastem a fotografovány při zvětšení 400x. Buňky ošetřované oběma látkami byly porovnány s exponenciálně rostoucími kontrolními buňkami.



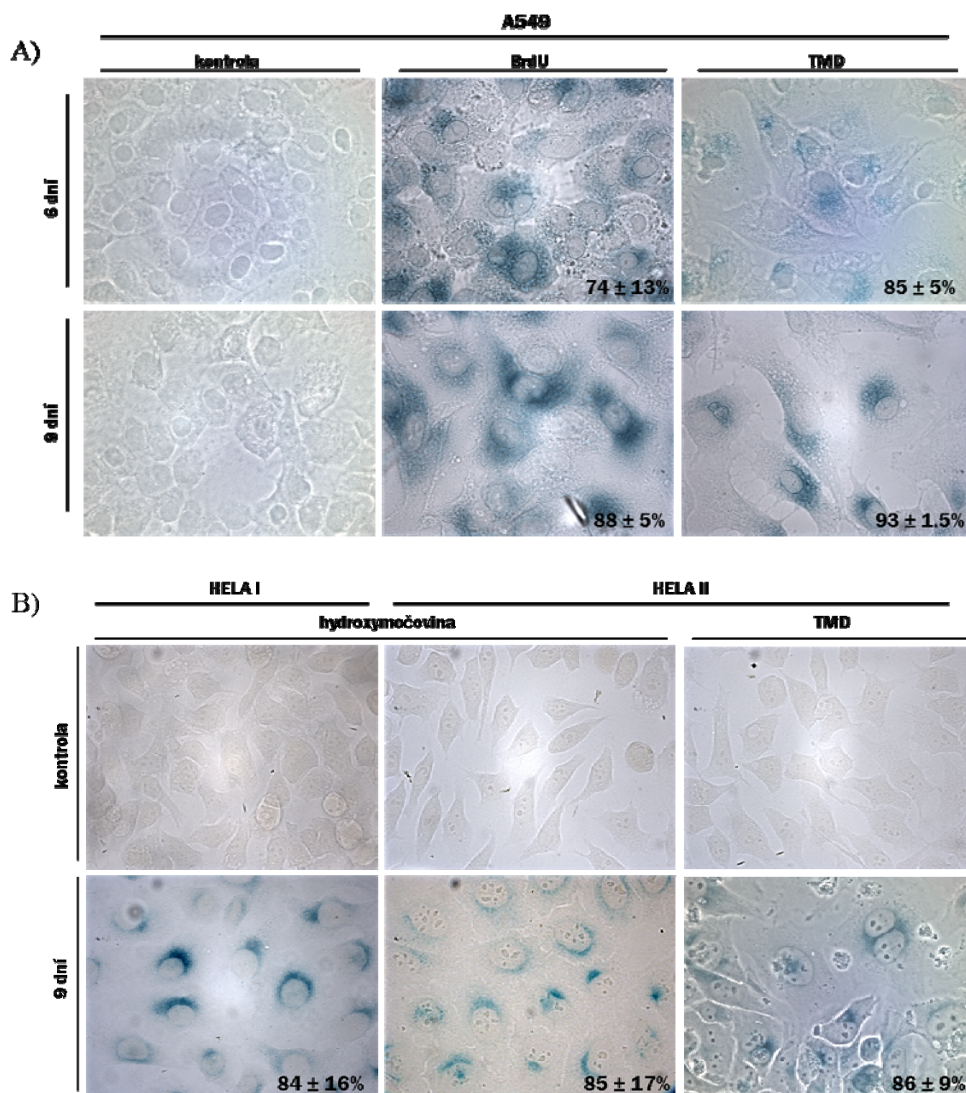
Obrázek 5-1: Dlouhodobé podávání tymidinu vyvolává morfologické změny charakteristické pro buněčnou senescenci. Stabilní buněčné linie HeLa II a A549 po vystavení 100 μ M BrdU a 2,5 mM TMD po dobu 9 dní. Snímky byly pořízeny pomocí fázového kontrastu světelného mikroskopu. Zvětšení 400x.

Buňky linií HeLa II a A549 po 9 dní ošetřované TMD ukázaly zástavu růstu a morfologické změny obdobně jako buňky po působení BrdU. Šipky na obrázku 5-1 (C, D, F, G) ukazují buňky, které zvětšily plochu cytoplazmy a rozšířily jádro v porovnání s kontrolními buňkami na obrázcích A a E bez působení látek.

Na základě potvrzení morfologických změn buněk, které vyvolal TMD, jsme ke konkrétnímu průkazu indukce senescence použili konvenční test na změření aktivity se senescencíspojené exprese β -galaktosidázy (SA- β -gal) (Dimri *et al.*, 1995). Pro tento účel podstoupily buňky A549 stejné působení TMD a BrdU po 9 dní jako v předchozí části experimentu. Zároveň nás zajímalo, zda existuje rozdíl mezi účinkem přímého a nepřímého inhibitoru ribonukleotid reduktázy. Pro tento účel byly buňky HeLa I a II vystaveny nepřímému inhibitoru (TMD) a přímému inhibitoru hydroxymočovině (HydroxyUrea, HU) (Yogev *et al.*, 2006) po 6 a 9 dní.

Buňky všech linií byly nasazeny v denzitě 25 000 na cm^2 . V 80% konfluenci byly paralelně ošetřeny 2,5 mM tymidinem, 100 μ M BrdU a 150 μ M HU. Kontrolní kulturou byly exponenciálně rostoucí buňky bez působení látek v mediu. Za 6 a 9 dní byly buňky zafixovány a inkubovány s neutrálním substrátovým roztokem X-Gal. Množství senescentních buněk bylo kvantifikováno manuálně pomocí světelného pole fluorescenčního mikroskopu Leica DM 6000B s digitální barevnou kamerou 450 FX a to

v deseti náhodných zorných polích každého sklíčka (celkový počet zhodnocených buněk 3605) (viz 5.2.2).



Obrázek 5-2: Tymidin vyvolává zvýšenou expresi SA-β-galaktosidázy u A549 po 6 a 9 denním působení TMD a BrdU (A) a HeLa I a II po 9 denním působení HU a TMD (B). Zvětšení 630x. Čísla znázorňují procentuální zastoupení buněk pozitivních na SA-β-gal.

Na obrázku 5-2 je ověření indukce předčasné buněčné senescence u buněk A549 a HeLa I a II pomocí detekce SA-β-galaktosidázy. Senescentní buňky měly po 6 denní expozici TMD a BrdU zvýšenou aktivitu enzymu β-galaktosidázy. TMD u těchto buněk vyvolal mírně vyšší počet SA-β-gal-pozitivních buněk než BrdU (obr. 5-2A). Přestože HU a TMD působí jiným mechanismem účinku (přímá, resp. nepřímá inhibice ribonukleotid reduktázy) a byly použity v rozdílných koncentracích, výsledný efekt (tj. počet senescentních buněk) byl srovnatelný (viz obrázek 5-2B).

Protože se pro optimalizaci indukce senescence vyvolané expozicí genotoxickým látkám používá strategie dlouhodobého působení látek s nejnižším nutným cytotoxickým

účinkem, testovali jsme nižší i vyšší koncentrace TMD: 1 mM, 2,5 mM a 5 mM. Po 9 dnech bylo zjištěno, že 1 mM TMD na indukci senescence nestačí, což bylo nepřímo zjištěno již dříve (Engstrom *et al.*, 2007). Při koncentracích 2,5 a 5 mM vyvolal senescenci srovnatelně a ani 5 mM koncentrace TMD nevedla k buněčné smrti, ale k rozvoji senescence (data neukázána). Pro další experimenty byl proto použit TMD opět v koncentraci 2,5 mM.

Působení opakovaných dávek 2,5 mM TMD nevyvolalo apoptózu, ale trvalou zástavu buněčné proliferace spojenou s morfologickými změnami charakteristickými pro buněčnou senescenci (viz obrázek 5-1). Tento stav byl v další části experimentu prokázán jako předčasná buněčná senescence pomocí pozitivní detekce aktivity enzymu SA- β -galaktosidázy (viz obrázek 5-2). Obě zvolené linie reagovaly na působení TMD stejně jako DLD-1 buňky použité pro indukci opravných mechanismů (Engstrom *et al.*, 2007) a osvědčily se proto jako vhodný model pro další charakterizaci tymidinem indukované senescence.

4.4 Tymidin vyvolává perzistentní odpověď na poškození DNA

Za kauzální příčinu buněčné senescence se v současné době považuje neopravitelné poškození DNA, které vede k dlouhodobé signalizaci poškození DNA a s tím spojené zástavě buněčného cyklu (Bartková *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005; Rodier *et al.*, 2009).

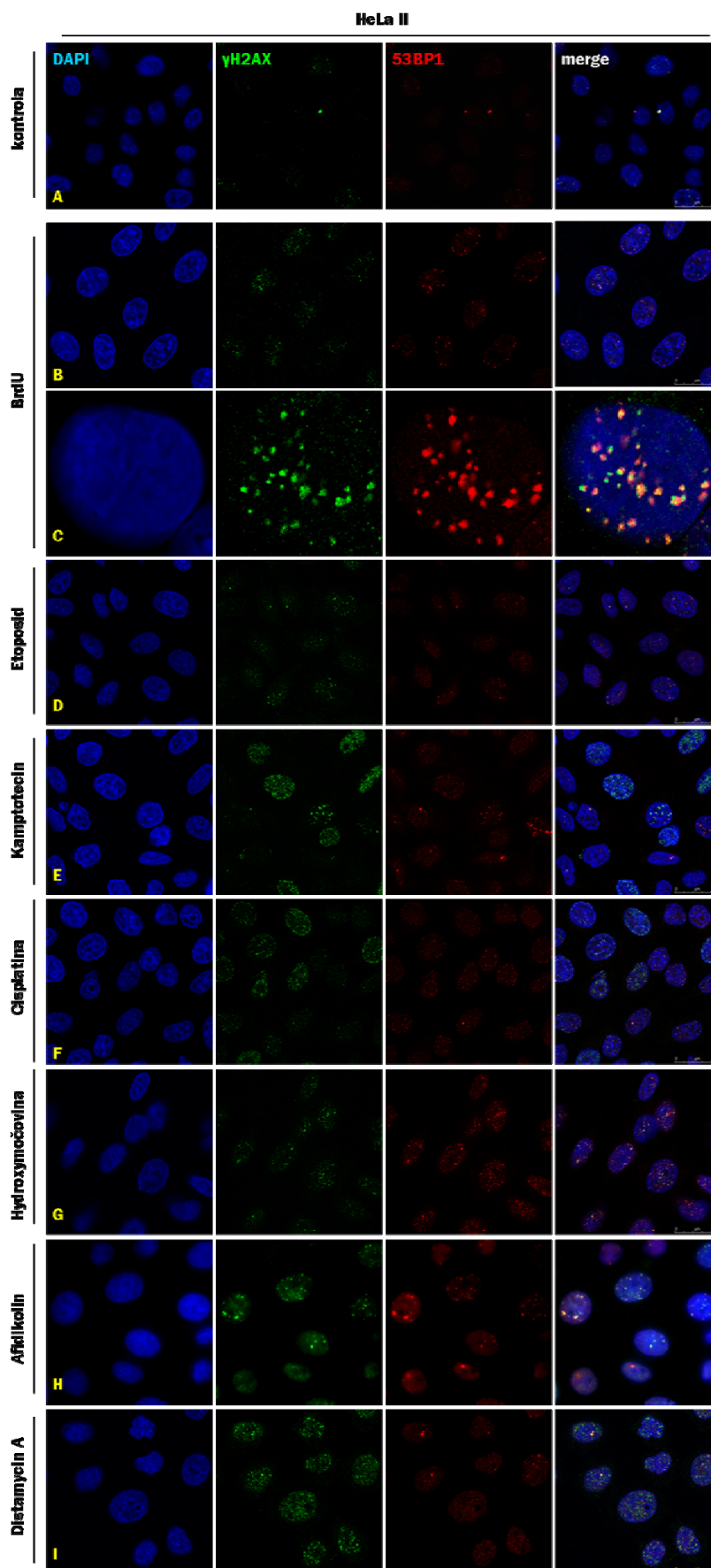
Tymidin byl navržen jako optimální prostředek k indukci zvýšené míry oprav DNA bez vyvolání genotoxických účinků (Engstrom *et al.*, 2007). Koncentrace TMD 1-2 mM je běžně používána k synchronizaci savčího buněčného cyklu na hranici fází G1 a S (Shedden *et al.*, 2002). Nicméně koncentrace 2,5 mM vyvolala indukci fragilních míst (Jacky *et al.*, 1983), což naznačuje, že tymidin v této koncentraci má genotoxický efekt.

Ačkoliv TMD v S-fázi aktivuje opravné mechanismy DNA, nebylo přímo dokázáno, že způsobuje poškození DNA *per se*. Zajímalo nás tedy, zda tato látka ve vyšší koncentraci vyvolá poškození DNA detekované tvorbou jaderných fokusů pozitivních na přítomnost proteinu 53BP1 a H2AX fosforylovanému na serinu 319 (S139; γ H2AX), které jsou indikátory zlomů DNA (Rodier *et al.*, 2009; Ward *et al.*, 2003).

K zodpovězení této otázky jsme použili nepřímé duální imunofluorescenční značení pomocí primárních protilátek proti 53BP1 a γ H2AX u buněk HeLa II, které byly vystaveny 2,5 mM TMD. Pro srovnání indukce poškození DNA jsme testovali také efekt vybraných

genotoxických látek používaných v chemoterapii nádorových onemocnění, u nichž bylo poškození DNA formou indukce dvouvláknových zlomů již popsáno. Testovanými látkami byl analog nukleotidu BrdU (Moris S.M., 1991), inhibitor topoizomerázy II etoposid (Caldecott *et al.*, 1990), inhibitor topoizomerázy I kamptotecin (Rothenberg M.L., 1997), látka vytvářející kovalentní příčné vazby v DNA cisplatina (Gonzalez *et al.*, 2001), inhibitor ribonukleotid reduktázy hydroxymocovina (HU) (Saban *et Bujak*, 2009), inhibitor DNA polymeráz α a δ afidikolin (Dhillon *et al.*, 2003) a antibiotikum distamycin A (Chandra *et al.*, 1970).

Buňky HeLa II byly nasazeny v denzitě 25 000 buněk na cm^2 a v 80% konfluenci paralelně ošetřeny 2,5 mM TMD, 100 μM BrdU, 10 μM etoposidem, 0,25 μM kamptotecinem, 1 μM cisplatinou, 150 μM hydroxymocovinou, 0,3 μM afidikolinem a 10 μM distamycinem A. Po 24 hodinách a 6 dnech (v případě TMD) byly buňky zafixovány a značeny duálně nepřímou imunofluorescencí pomocí myší protilátky proti γH2AX a králičí protilátky proti 53BP1 (sekundární protilátky Alexa Fluor 488 proti myší primární protilátce a 568 proti králičí primární protilátce). Jako kontroly byly použity exponenciálně rostoucí buňky bez přidání TMD do média (viz 5.2.3).

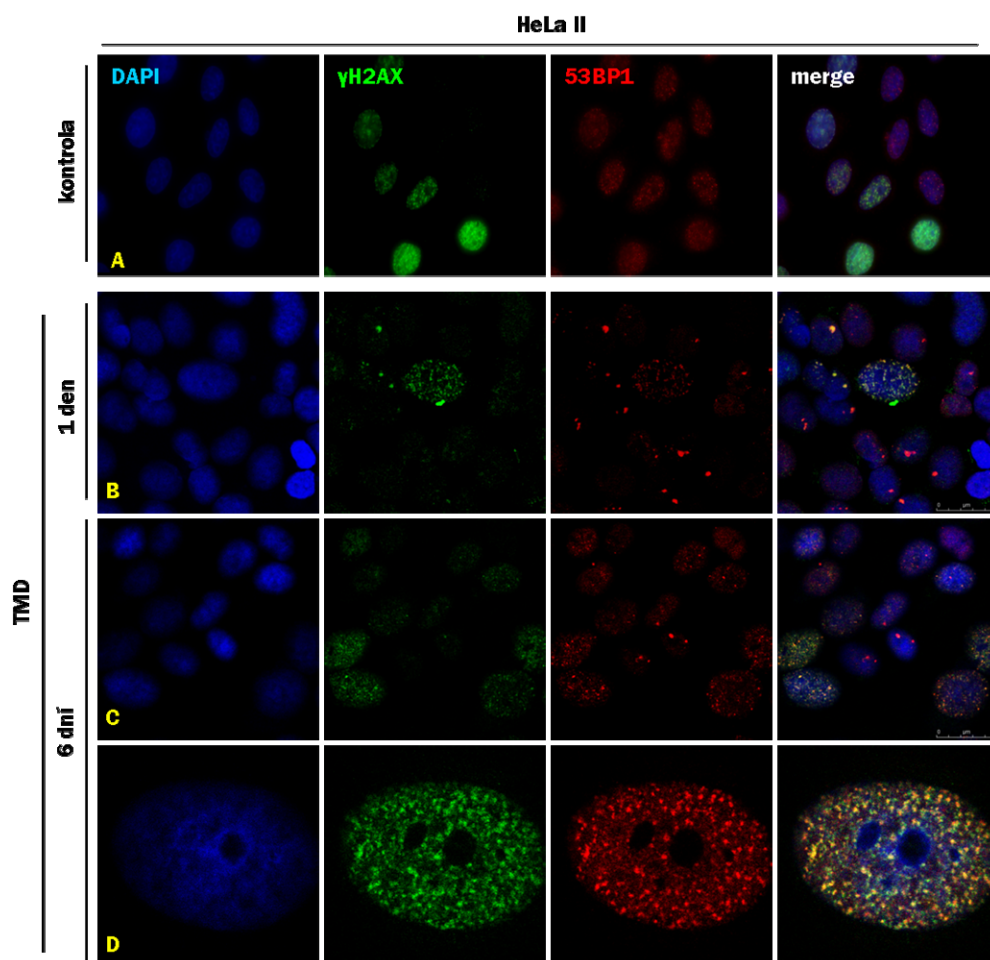


Obrázek 5-3: Tvorba jaderných fokusů poškození DNA (γ H2AX a 53BP1) po 1 dni působení sedmi různými genotoxickými látkami: kontrola (A), 100 μ M 5'-bromo-2'-deoxyuridin (B), 10 μ M etoposid (C), 0,25 μ M kamptotecin(D), 1 μ M cisplatina (E, F),

150 μM hydroxymočovina (G), 0,3 μM afidikolin (H) a 10 μM distamycin A (I). Obrázky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu. Buňky HeLa II byly značeny duálně nepřímou imunofluorescencí protilátkami proti γH2AX (zeleně) a 53BP1 (červeně). Jádra byla detekována DAPI (modře). Všechny snímky jsou ve zvětšení 1000x kromě panelu (C), který má zvětšení 1000x a digitální zvětšení 5,4x.

Na obrázku 5-3 je prezentováno jednodenní působení vybraných genotoxických látek, které způsobilo různou míru formace jaderných fokusů testovaných indikátorů poškození DNA v závislosti na použité látce.

Kontrolní buňky (obr. 5-3, panel A) mají neaktivní H2A.X a normální vzhled proteinu 53BP1, kdy je v jádře přítomna akumulace 53BP1 soustředěná do jednoho místa (tzv. OPT domain). Poškození DNA je příčinou fosforylace a relokace γH2AX a 53BP1 (viz 3.2.1.3.1.1). Etoposid a BrdU ve srovnání s ostatními látkami indukovaly menší množství malých fokusů γH2AX a 53BP1 (obr. 5-3B, C, D). Cisplatina a distamycin A indukovaly velké množství malých fokusů (ob. 5-3F, I). Kamptotecin, hydroxymočovina a afidikolin vytvořily vedle difúzního vzhledu malých fokusů i větší množství velkých fokusů (obr. 5-3E, G, H).

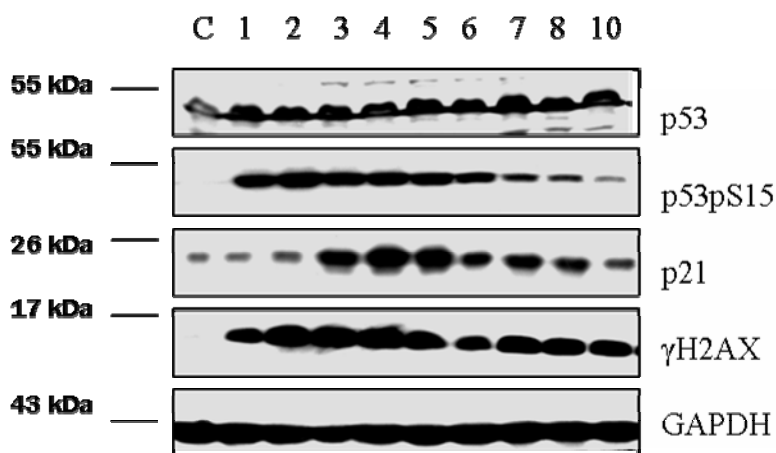


Obrázek 5-4: *Tymidin po jednodenním působení vyvolává tvorbu fokusů poškození DNA (γ H2AX a 53BP1). Buňky HeLa II byly duálně imunofluorescenčně značeny protilátkami proti γ H2AX (zeleně) a 53BP1 (červeně) a jádra byla detekována interkalačním barvivem DAPI (modře). Snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu ve dvou různých zvětšeních. Panely A, B, C jsou se zvětšením 1000x, panel D navíc s digitálním zvětšením 5,4x.*

Na obrázku 5-4 je představena formace jaderných fokusů poškození DNA, prezentovaných aktivací a relokizací proteinů γ H2AX a 53BP1 v odpovědi na působení TMD u buněk HeLa II. Již po 1 dni testované indikátory poškození DNA utvářely v buněčných jádrech malé fokusy, které s pokračováním inkubace buněk v TMD (6 dní) přibývaly. Tyto fokusy byly podobné těm, které vyvolalo jednodenní působení cisplatiny a hydroxymocoviny (viz obr. 5-3F, G). Kontrolní neošetřené buňky ukázaly normální difúzní vzhled obou testovaných proteinů.

Protože TMD při kontinuálním šestidenním podávání zvýšil počet fokusů poškození DNA, bylo nutné rozlišit, zda jde o kontinuální formaci nových fokusů či o persistenci neopravitelných lézí (PDDF, viz 2.3.2.1), které jsou jedním ze znaků senescence (Rodier *et al.*, 2009). Pro zodpovězení této otázky byly buňky v další části experimentu následně vystaveny pouze jediné dávce TMD, který byl za tři dny inkubace z média odstraněn a buňky byly sledovány při kultivaci v čistém médiu po dobu dalších sedmi dní. Poté byla provedena analýza imunoblotem s detekcí markerů aktivní odpovědi na poškození DNA: fosforylovaného γ H2AX, p53 a jeho aktivované formy p53 fosforylované na serinu 15 (S15) (viz 3.2.1.4.1) (Zhang *et al.*, 2005). Pro ověření indukce inhibitorů buněčného cyklu byla provedena detekce proteinu p21, což je inhibitor komplexu CDK2/cyklinE, a jeho transkripce je pod kontrolou p53 (Ressler *et al.*, 2006).

Buňky linie A549 byly v 80% konfluenci ošetřeny jednou tři dny trvající expozicí 2,5 mM TMD. Po dobu 10 dnů byl každý den sklizen jeden vzorek. Populace buněk byla lyzována, proteinová směs byla separována pomocí SDS polyakrylamidové elektroforézy a elektrickým transferem přenesena na membránu, na které byly jednotlivé proteiny značeny protilátkami (králíčí proti-lidskému fosfoproteinu p53 (S15), králíčí proti-lidskému p53, myší proti-lidskému p21, myší proti-lidskému fosfoproteinu γ H2AX a myší proti-lidskému GAPDH) a detekovány chemiluminiscencí expozicí na rentgenový film (viz 5.2.4).



Obrázek 5-5: Jednorázové podání tymidinu vyvolává perzistentní poškození DNA a aktivuje inhibitory buněčného cyklu. Immunoblotová analýza proteinů izolovaných z buněk A549 ošetřených jednou dávkou 2,5 mM TMD. C- proteinový lyzát z kontrolních buněk bez TMD; (1-10) den 1 až den 10.

Na obrázku 5-5 jsou prezentovány hladiny exprese testovaných proteinů u buněk A549. V souladu s předchozím experimentem (viz obrázek 5-4B), jednorázové podání TMD vyvolalo fosforylaci proteinu γ H2AX již po 24 hodinách. Hladina γ H2AX přetrvávala téměř nezměněná až do konce experimentu (10. den). Hladina p53 se pozorovatelně zvedala rovněž po 24 h, stejně tak jeho aktivovaná forma (p53pS15), která na rozdíl od totálního p53 po kulminaci okolo druhého dne k desátému dni postupně klesala. Hladina p21 narůstala vzhledem k ostatním testovaným proteinům se zpožděním a kulminovala okolo čtvrtého dne, pak opět postupně klesala k desátému dni. Působení TMD vyvolalo poškození DNA již po 24 hodinách a to jak u buněk HeLa II tak i A549 (viz obrázek 5-4). Toto poškození bylo podobné účinku genotoxických látek hydroxymočoviny a cisplatin (viz obrázek 5-3F,G). TMD vyvolal po jediné dávce zástavu buněčného cyklu indukci markerů poškození DNA a zvýšenou expresi p21, inhibitoru CDK2/cyklinuE (viz obrázek 5-5). Hladiny markerů poškození DNA přetrvávaly po celých 10 dní po jedné dávce TMD. To naznačuje, že tymidin navozuje perzistentní poškození DNA, které přetrvává v buňce dlouhou dobu a které by mohlo být příčinou předčasné senescence pozorované po podání TMD.

4.5 Počet jaderných tělísek PML a hladina PML se zvedá v buňkách vystavených TMD

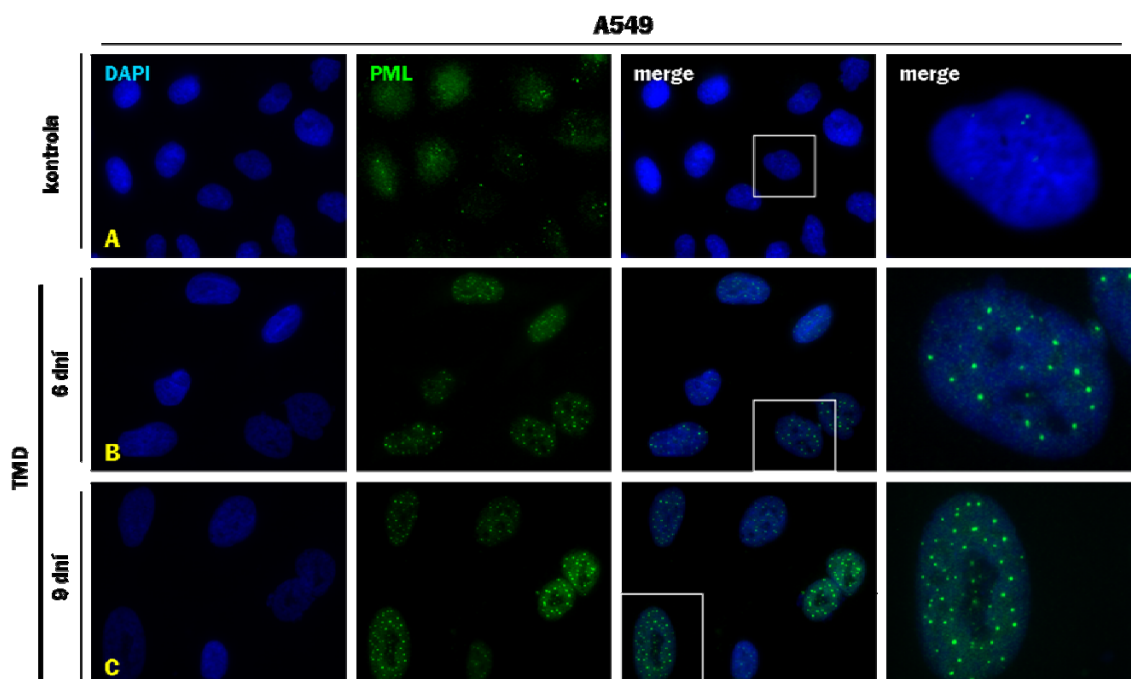
Buněčná senescence je kromě perzistentní aktivace indikátorů poškození DNA (Rodier *et al.*, 2009) a stabilizace proteinů zástavy buněčného cyklu (Pascal *et al.*, 2005) charakterizována i indukcí nádorových supresorů (Bischof *et al.*, 2002). Mezi takové

proteiny patří zejména p53, pRb a PML, které vzájemně interagují (Pearson *et al.*, 2001).

Expresí proteinu PML je u aneuploidních imortalizovaných buněčných linií ve srovnání s normálními buňkami tkání na nízké hladině (Salomoni *et al.*, 1995). Bylo však popsáno, že se jeho hladina zvyšuje za doprovodné tvorby jaderných tělísek PML nejen u replikační senescence normálních buněk (Robles *et al.*, 1999), ale také u senescence indukované aktivovanými onkogeny (Ferbeyre *et al.*, 2000). Na základě dalších publikací dokazujících, že je PML indukován k tvorbě jaderných tělísek v různých druzích chemicky vyvolané předčasné senescence (Bischof *et al.*, 2001; Janderová-Rossmeislová *et al.*, 2007), jsme chtěli otestovat hypotézu, zda je PML indukován také v senescenci vyvolané expozicí TMD. K zodpovězení této otázky byly modelové buňky A549 po působení TMD značeny nepřímou imunofluorescencí pomocí myší protilátky specifické proti všem izoformám PML.

Na základě experimentů, při kterých bylo také zjištěno, že se po různých druzích stresu (např. teplotní šok, expozice arsenu, poškození DNA a aberantní exprese onkogenů) zvyšuje PML na úrovni proteinu (Pearson *et al.*, 2001), byl v další části experimentu celkový protein izolovaný z buněk A549, exponovaných jedné dávce TMD, analyzován pomocí imunoblotu detekcí králičí protilátkou specifickou proti všem izoformám PML.

Buňky A549 byly nasazeny v denzitě 20 000 buněk/cm², v 80% konfluenci ošetřeny 2,5 mM TMD, který byl kontinuálně přidáván po dobu 6 a 9 dní. Poté byly zafixovány a značeny nepřímou imunofluorescencí (sekundární protilátka Alexa Fluor 488). Snímky byly pořízeny pomocí fluorescenčního mikroskopu Leica s černobílou kamerou FX 350 ve zvětšení 1000x (viz 5.2.3).



Obrázek 5-6: *Tymidin indukuje tvorbu jaderných tělísek PML. Buňky A549 byly po 6 a 9 denním působení TMD imunofluorescenčně značeny protilátkou proti PML (zeleně) a DNA byla značena DAPI (modře). Snímky byly pořízeny pomocí fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 1000x (první tři sloupce) a jedno jádro (bílý rámeček) bylo zvětšeno digitálně dodatečně (poslední sloupec).*

Na obrázku 5-6 je představen efekt působení TMD v délce 6 a 9 dní na formaci jaderných tělísek PML u buněk A549. Buňky, které byly po TMD senescentní, měly zvýšenou tvorbu jaderných tělísek PML. Počet tělísek byl vyšší po 9 dnech (obrázek 5-6C) než po 6 dnech působení TMD (obrázek 5-6B).

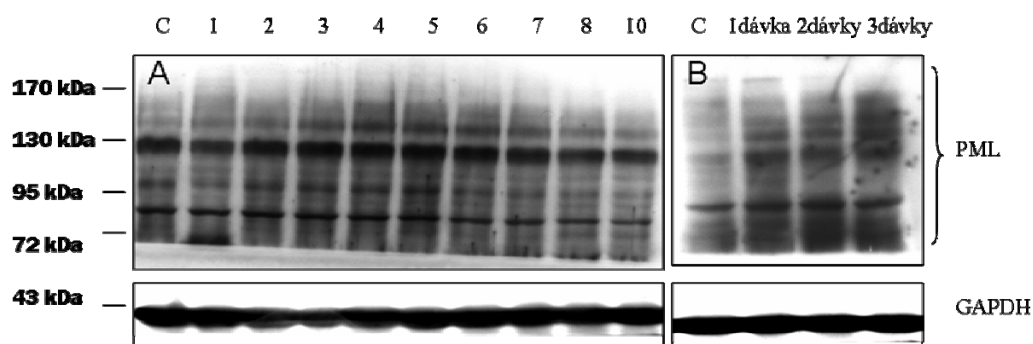
Ke zhodnocení, zda je formace jaderných tělísek PML po podání TMD spojena se zvýšením hladiny proteinu PML, bylo použito stanovení hladiny proteinu PML pomocí imunoblotové analýzy.

Buňky linie A549 byly vystaveny jedné dávce TMD po 10 dní a následně byl každý den sklizen jeden časový bod; nebo opakovaným dávkou (viz obr. 5-7): jedné (první tři dny), dvěma (první a třetí den) a třem (každý druhý den) dávkám TMD po celkovou dobu 6 dní, 6. den byly buňky sklizeny na imunoblot (viz výše).



Obrázek 5-7: *Schéma dávkování tymidinu.*

Celkový protein všech vzorků byl separován pomocí SDS polyakrylamidové elektroforézy. Proteiny byly v dalším kroku přeneseny na nitrocelulózové membrány s použitím mokrého typu elektrického přenosu. Membrány byly inkubovány s protilátkami (králíčí proti PML a myší proti GAPDH), které byly detekovány chemiluminiscencí expozicí na rentgenový film (viz 5.2.4).



Obrázek 5-8: Tymidin zvyšuje hladinu celkového a modifikovaného PML. PML v A549 po jedné dávce TMD od 1. po 10. den (1-10; panel A); po jedné, dvou a tří dávkách TMD buněk sklizených po 6 dnech (panel B). C - kontrolní buňky bez TMD.

Na obrázku 5-8 je prezentováno zvýšení exprese a/nebo post-translačních modifikací proteinu PML po působení jedné či opakovaných dávek TMD. Z obrázku 5-8A vyplývá, že jedna dávka TMD zvýšila pouze množství modifikací izoform PML. Tyto vysokomolekulární formy (nad 130 kDa) kulminovaly v 5. den od působení jedné dávky TMD (obrázek 5-8A), poté postupně klesaly. V buněčné populaci od šestého dne postupně přibývaly buňky s absencí senescentního fenotypu. Opakované podávání TMD (každý druhý a třetí den) naproti tomu vedlo současně i ke zvýšení nemodifikovaných isoform PML (obrázek 5-8B).

Lze uzavřít, že dlouhodobé vystavení buněk TMD zvedá jak počet jaderných tělísek PML, tak celkovou hladinu PML. Výskyt vysokomolekulárních forem naznačuje post-translační modifikace PML indukované podáním TMD.

4.6 Závislost formace jaderných tělísek PML na p53

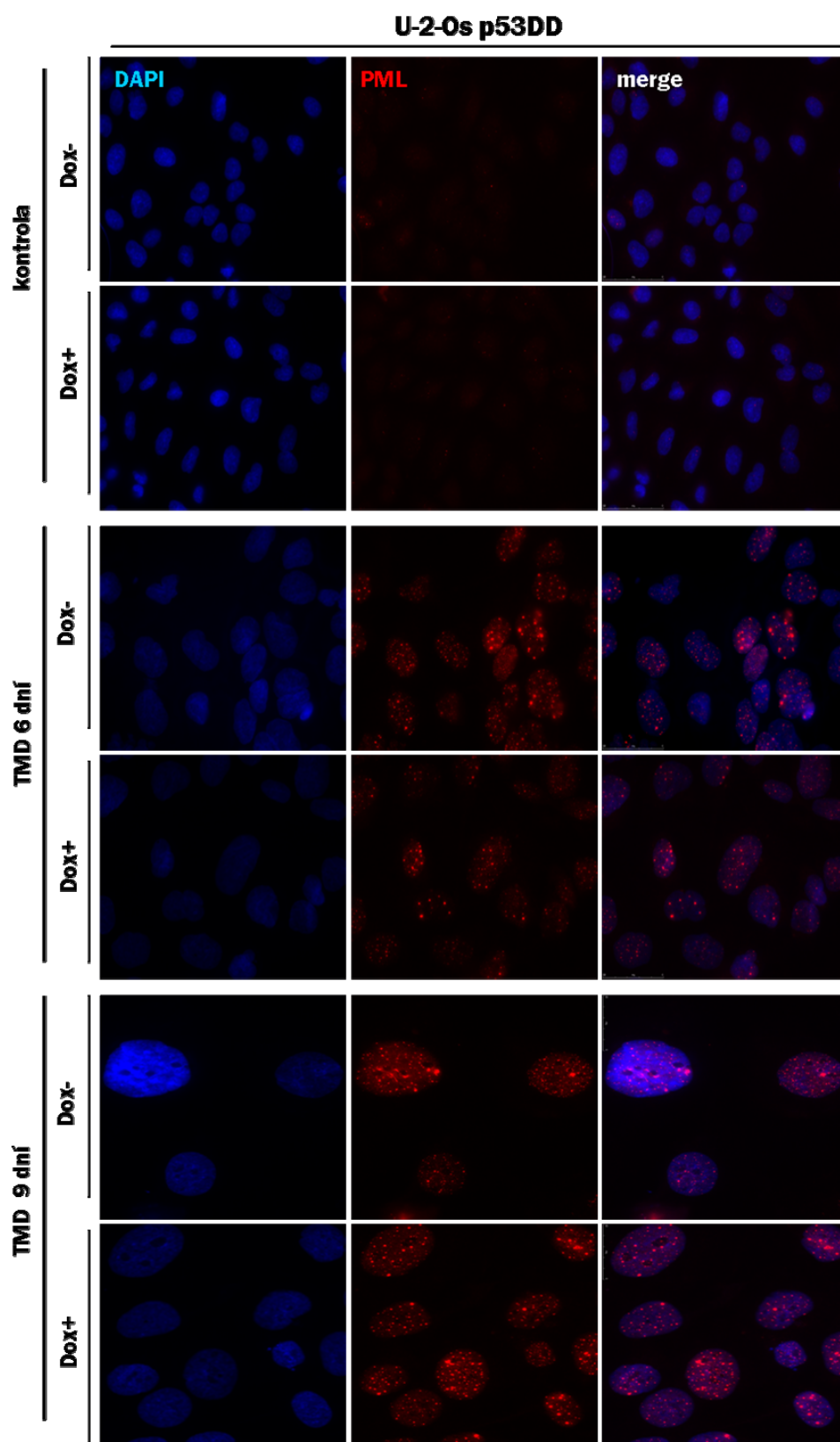
Bylo popsáno, že je myší p53 stabilizován v odpovědi buněk na chemické poškození DNA a to pouze u buněk s normální expresí PML ve srovnání s PML^{-/-} buňkami (Louria-Hayon *et al.*, 2003). U lidských buněk je p53 transientně asociován s jadernými tělísky PML po aktivaci onkogenu Ras (Ferbeyre *et al.*, 2000), expozici ionizujícímu i neionizujícímu záření (Carbone *et al.*, 2002) a dokonce při exogenní expresi PML izoformy IV (Fogal *et al.*, 2000). Bylo také zjištěno, že exprese genu PML je pod kontrolou proteinu

p53 (Stanchina *et al.*, 2004). Tyto skutečnosti naznačují, že by mohla být formace PML NBs v závislosti na stabilizaci p53.

Protože TMD vyvolává poškození DNA (viz obr. 5-4), které aktivuje p53 fosforylací na S15 (viz obr. 5-5), čímž jej stabilizuje, a zároveň zvyšuje počet PML NBs (viz obr. 5-6) doprovázený zvýšenou expresí a/nebo post-translačními modifikacemi PML (viz obr. 5-8), chtěli jsme zjistit, zda tymidinem indukovaná formace jaderných tělísek PML a zvýšení hladiny PML je závislé na p53.

Pro tento účel jsme využili jako model linii nádorových buněk osteosarkomu U-2-Os p53DD se stabilní doxycyklinem regulovatelnou (DOX off) expresí dominantně negativní (DN) formy (deleční mutanty) proteinu p53 (Sörrensen *et al.*, 2000; Mailand *et al.*, 2000). Exprese této formy byla potlačena doxycyklinem (Dox+) a buňky exprimovaly normální p53 (p53on). Po odmytí doxycyklinu (Dox-) z média došlo za 24 hodin k indukci exprese DN formy p53, která asociovala s normálním proteinem p53 (tetramer) a inhibovala jeho funkci (p53off). K určení možného rozdílu v indukci formace jaderných tělísek PML u senescentních buněk s funkčním i nefunkčním proteinem p53 bylo provedeno nepřímé imunofluorescenční značení proteinu PML.

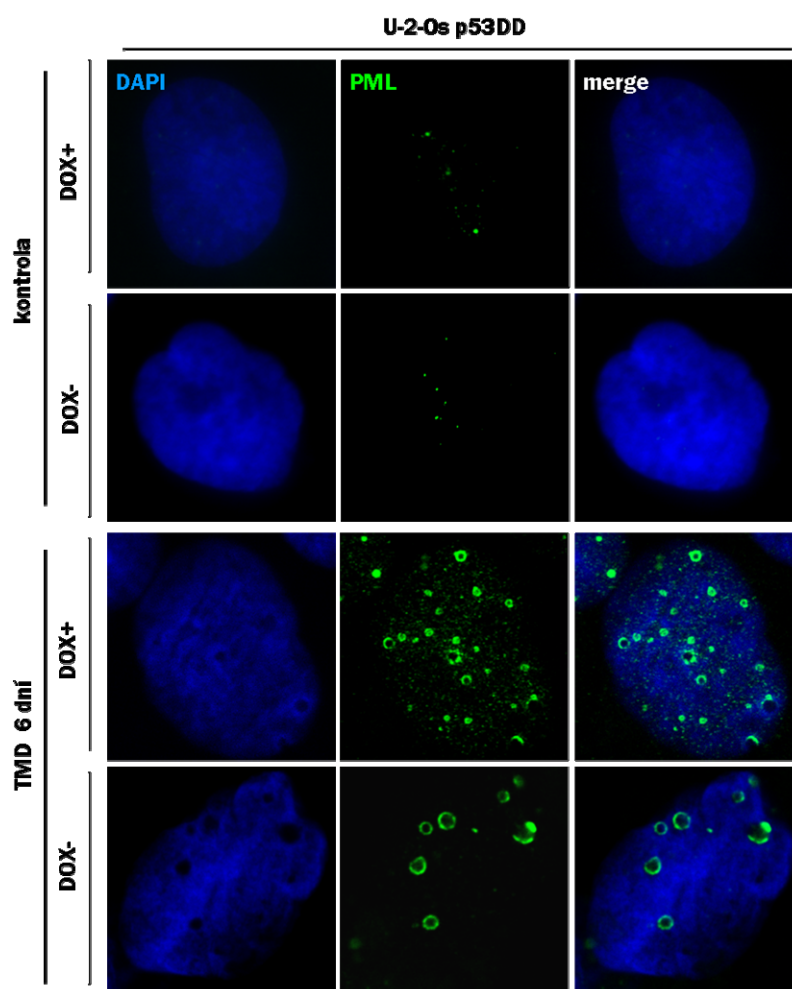
Buňky U-2-Os p53DD Dox+/Dox- byly nasazeny v denzitě 20 000 buněk na cm² a v 80% konfluenci ošetřeny TMD, který byl přidáván po 6 a 9 dní. Poté byly buňky zafixovány a značeny nepřímou imunofluorescencí myší protilátkou proti PML (sekundární protilátka Cy3). Jaderná tělíska PML byla snímána pomocí fluorescenčního mikroskopu Leica DM 6000 s černobílou digitální kamerou 350 FX a pozorována také pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS Sp5 (viz 5.2.3).



Obrázek 5-9: *Expres dominantně negativní formy p53 nemá vliv na tvorbu jaderných tělísek PML indukovanou tymidinem. Buňky U-2-Os p53DD (Dox+/Dox-) byly vystaveny TMD po dobu 6 a 9 dní a imunofluorescenčně značeny proti PML (červeně). Jádra značena DAPI (modře). Snímky byly pořízeny pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zvětšení 1000x.*

Na obrázku 5-9 je prezentován vliv exprese DN formy p53 na tvorbu tělísek PML po indukci senescence TMD. Kontrolní buňky (Dox+/Dox-) měly stejné množství PML NBs bez ohledu na expresi DNp53. Rovněž buňky po 6 a 9 denním vystavení TMD se nelišily významně tvorbou jaderných tělísek PML s ohledem na expresi DNp53. Narůstající tvorba tělísek PML v U-2-Os p53DD korelující s délkou kultivace byla obdobná jako u buněk A549 z experimentu 5-3 (viz obrázek 5-6).

Během tohoto experimentu bylo při pozorování pomocí konfokálního mikroskopu zjištěno, že testované buňky tvoří balónovité/barelovité struktury PML (anglicky popisované jak „PML doughnuts“) (viz 3.7.3.1). Tyto struktury byly popsány v souvislosti se sekvestrací velkého množství proteinů zahrnutých do oprav poškozené DNA ([Sterndorf et al., 1997](#)) a remodelace chromatinu ([Luciani et al., 2006](#)). Rovněž byl popsán obdobný typ struktur PML asociujících s buněčnými jádřky („PML nucleoli-derived structures“; PML-NDs) ([Jaderová-Rossmeislová et al., 2007](#)).



Obrázek 5-10: Tymidin indukuje tvorbu balónovitých struktur PML okolo jadérek. Snímky pořízeny ze vzorku buněk U-2-Os p53DD (Dox+/Dox-) po 6 denním působení

TMD. Jádra značena DAPI (modře). Obrázky pomocí konfokálního mikroskopu. Zvětšení 1000x a digitální zoom 5,4 krát.

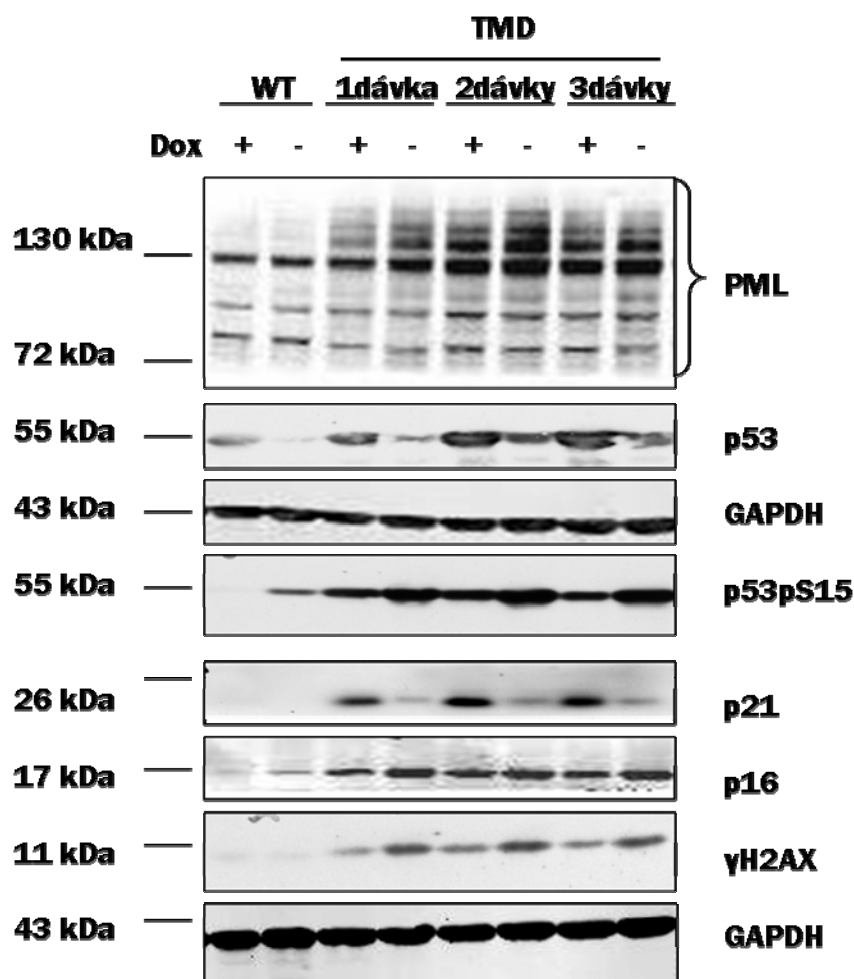
Na obrázku 5-10 je dokumentována formace balónovitých jaderných tělísek PML asociovaných s DAPI-negativními oblastmi po indukci TMD, které se vytvářejí v oblasti jadérek. Tyto struktury byly pozorovány u přibližně 50% buněk U-2-OS p53DD a nebyly nalezeny u buněk A549.

Expresí dominantně negativní formy p53 nemá vliv na formaci tělísek PML jak v kontrolních tak v buňkách vystavených tymidinu.

4.7 Hladina PML není ovlivněna expresí dominantně negativní formy p53

Na základě dat z předchozího experimentu 5.4, který neukázal žádný rozdíl ve formaci jaderných tělísek PML u buněk s expresí dominantně negativní formy p53 (viz obr. 5-9), jsme tento výsledek ověřili na úrovni hladin proteinů PML a p53 pomocí imunoblotu a to spolu s analýzou exprese známého transkripčního cíle p53 – p21, který je indukován tymidinem (viz obr. 5-5).

Buňky byly rozděleny na tři vzorky a nasazeny v denzitě 25 000 buněk na cm². V 80% konfluenci byly ošetřeny TMD, který byl přidán podle schéma v experimentu 5.4 (viz obr. 5-7). Buňky byly 6. den sklizeny, celkový protein byl separován pomocí SDS PAGE, přenesen na membránu a detekován s primárními protilátkami: králičí proti PML, králičí proti p53, králičí proti fosfoproteinu p53 (S15), myší proti p21, myší proti p16, myší proti γ H2AX a myší proti GAPDH. Imunoreaktivní signál byl detekován chemiluminiscencí expozicí na rentgenový film (viz 5.2.4).



Obrázek 5-11: Vliv exprese dominantně negativní formy p53 na hladiny markerů poškození DNA a buněčné senescence.

Z výsledku imunoblotové analýzy (obr. 5-11), která umožnila srovnat expresi PML u buněk bez a s expresí DNp53 vyplynulo, že funkční deplece p53 neměla vliv na hladinu PML. TMD zvýšil hladinu exprese a/nebo množství post-translačních modifikací PML mnohem výrazněji u U-2-OS p53DD než u A549 (viz obr. 5-8) a to již po jediné dávce. Naproti tomu měla exprese dominantně negativní formy p53 vliv na celkovou hladinu p21 po indukci TMD, v p53 off buňkách byla hladina p21 výrazně nižší než v buňkách s normální expresí p53. Slabá indukce p21 u buněk bez funkčního p53 po opakovaném podávání TMD je zřejmě efektem nedokonalé inhibice proteinu p53 jeho negativně dominantní formou.

p16 byl naopak vyšší u buněk s nefunkčním p53, což naznačuje kompenzační aktivaci pRb dráhy (viz 2.4) (Mallette *et al.*, 2004) vedoucí k indukci trvalé zástavy buněčného cyklu spojené s senescencí indukovanou TMD, která nebyla ovlivněna expresí DNp53 (viz níže). Exprese DNp53 rovněž vedla ke zvýšení hladiny proteinu γH2AX, což

naznačuje přetrvávání poškození DNA v buňkách s oslabením p53-závislé transkripce genů, které se účastní reparačních mechanismů (Gresko *et al.*, 2009).

Lze uzavřít, že exprese dominantně negativní formy p53 neměla vliv na hladinu PML po indukci senescence tymidinem, což naznačuje, že exprese PML u tohoto typu senescence je nezávislá na p53.

4.8 Vývoj tymidinem-indukované senescence není závislý na proteinu p53

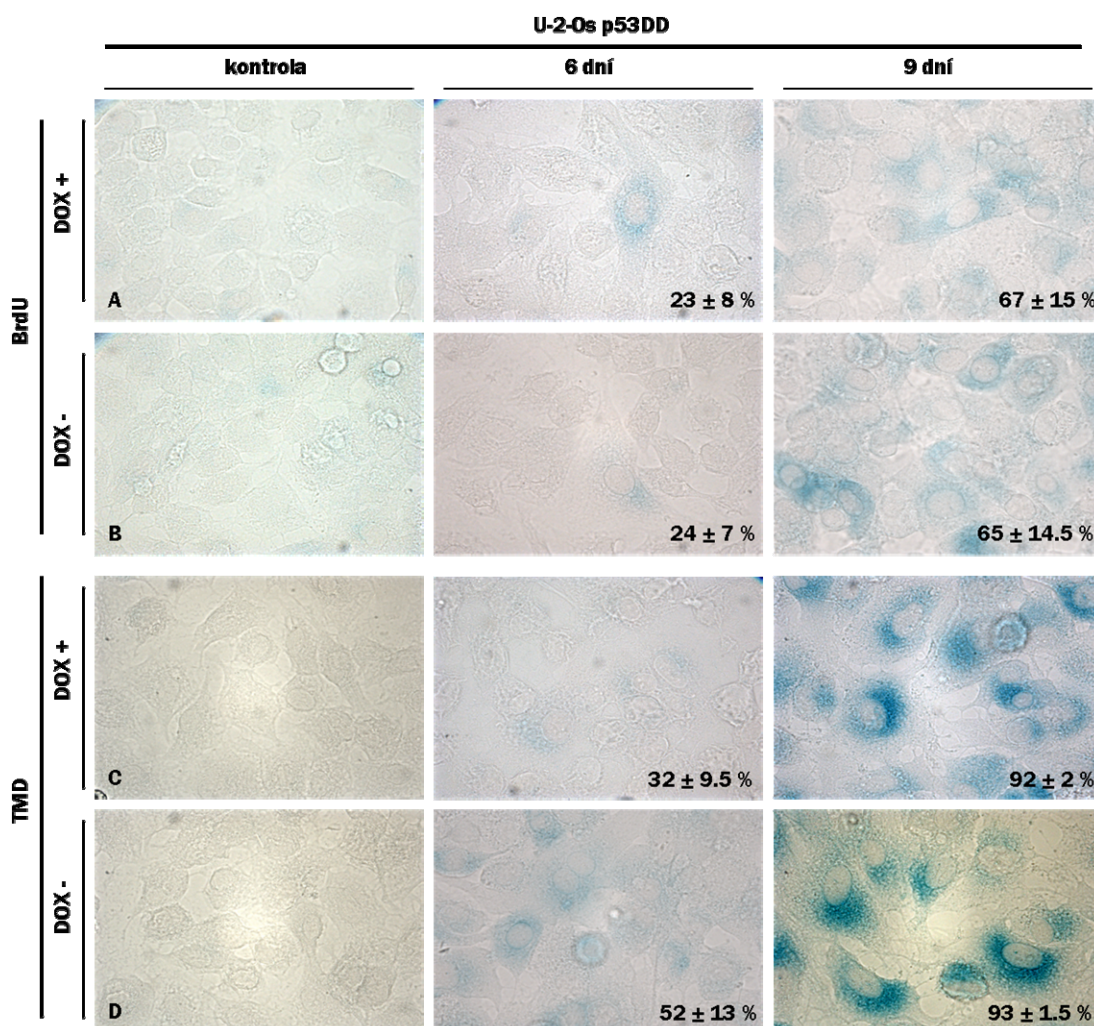
V experimentech před téměř dvěma desítkami let bylo zjištěno, že je protein p53 u lidských hematopoetických progenitorových buněk stabilizován po vzniku poškození DNA vyvolaném expozicí UV záření nebo inhibitoru topoizomerázy II actinomycinu D (Kastan *et al.*, 1991). Dále bylo zjištěno, že v případě ablace p53 u myších buněk nedochází k iniciaci předčasné senescence indukované aktivovaným onkogenem Ras (Ferbeyre *et al.*, 2002). Protože TMD v testované koncentraci vyvolal poškození DNA (viz experiment 5.5) i senescenci (viz experiment 5-1), zajímalo nás, zda buňky bez proteinu p53 podstoupí také senescenci, která bude nezávislá na p53, nebo naopak apoptózu.

Pro zjištění, zda je vývoj tymidinem-indukované předčasné senescence závislý na p53, jsem působila TMD na buňky U-2-OS p53DD. K průkazu indukce senescence byl opět použit histochemický test aktivity SA- β -galaktosidázy (Dimri *et al.*, 1995). Kontrolní indukce předčasné senescence byla vyvolána pomocí BrdU (viz experiment 5-1, obr. 5-2A). Kromě testovaných markerů DDR hladiny (γ H2AX, p53, p53pS15), byla jako kontrola účinnosti exprese DN formy p53 a inhibice normálního p53 u testovaných buněk použita detekce hladiny p21.

Buňky U-2-OS p53DD (Dox+/Dox-) byly nasazeny na sklička v denzitě 20 000 buněk na cm². Za 24 hodin byly paralelně ošetřeny 2,5 mM TMD a 100 μ M BrdU, se kterými byly kontinuálně inkubovány po 6 a 9 dní. Vzorek buněk U-2-OS p53DD (Dox+/Dox-) pro imunoblotovou analýzu byl ošetřen TMD a to po 3 dny.

Buňky pro histochemické značení byly po inkubaci s oběma látkami fixovány a inkubovány se substrátovým barvicím roztokem X-Gal. Pak byly pozorovány pod fázovým kontrastem světelného mikroskopu a ke zhodnocení modrého zabarvení aktivity β -galaktosidázy bylo použito snímání ve světelném poli. Kontrolní kulturou byly tytéž exponenciálně rostoucí linie bez působení látek v médiu. Množství jednotlivých buněk představujících senescentní buňky bylo kvantifikováno ve světlém poli fluorescenčního

mikroskopu Leica DM 6000B s digitální barevnou kamerou FX 450 a to v deseti náhodných zorných polích. Všechny obrázky jsou ve zvětšení 630x (viz 5.2.2).

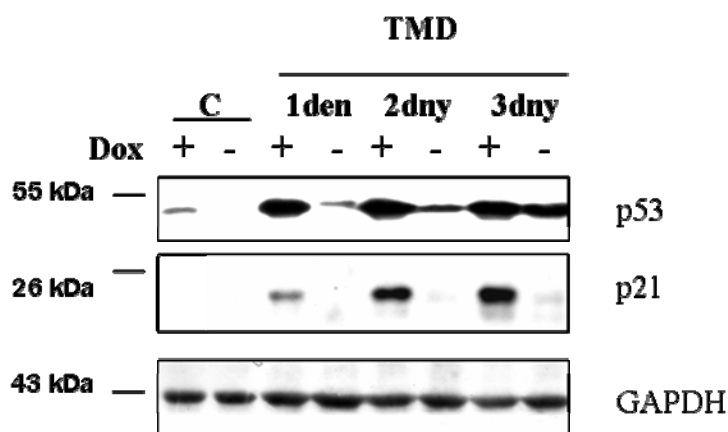


Obrázek 5-12: Tymidinem indukovaná senescence není závislá na p53. Kultury U-2-OS p53DD (Dox+/Dox-) ošetřené BrdU (horní panel) a TMD (dolní panel) po 6 a 9 dní byly obarveny na aktivitu SA-β-gal. Čísla vpravo dole představují procentuální zastoupení buněk pozitivních na SA-β-gal v buněčné populaci. Zvětšení 630x.

Obrázek 5-12 ukazuje indukci předčasné tymidinem indukované senescence u buněk linie U-2-OS p53DD, po detekci SA-β-galaktosidázy. Vzorky p53on i p53off měly v 9. den stejný počet SA-β-gal pozitivních buněk (92±2% a 93±1,5%), mírně se lišily se v 6. den po podání TMD (52±13% u buněk bez p53 a 32±9,5% s p53, obr. 5-12C, D).

Buňky U-2-OS p53DD (Dox+/Dox-) byly paralelně s předchozí částí experimentu vystaveny jedné dávce TMD po 3 dny, kdy byl lyzát sbírán u všech vzorků každý den. Celkový protein všech vzorků byl separován pomocí SDS polyakrylamidové elektroforézy. Proteiny byly v dalším kroku přeneseny na nitrocelulózovou membránu, která byla inkubována s protilátkami (králičí proti PML, myší proti p21 a myší proti GAPDH) a

imunoreaktivní signál byl detekován chemiluminiscencí expozicí na rentgenový film (viz 5.2.4).



Obrázek 5-13: Exprese p21 po vystavení U-2-Os p53DD tymidinu byla závislá na intaktní funkci p53.

Pozitivní kontrolou správné funkce doxycyklin-inducibilního systému pro potlačení funkce normálního proteinu p53 je ukázka na obrázku 5-13. p21 jako transkripční substrát aktivovaného p53 měl po indukci senescence TMD vyšší hladinu u buněk s normálním p53.

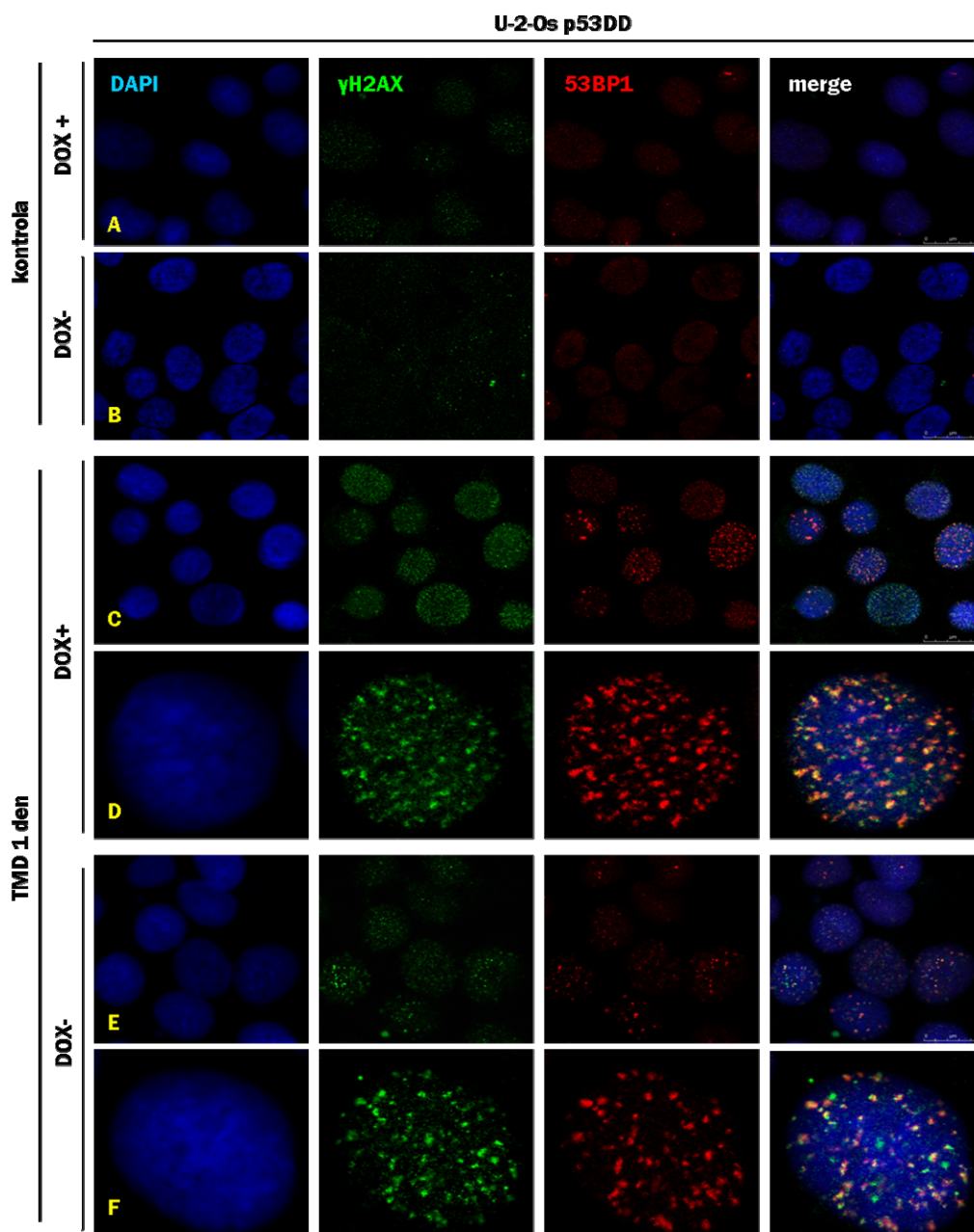
Lze uzavřít, že exprese dominantně negativní formy p53 nemá vliv na rozvoj tymidinem-indukované senescence, což naznačuje, že p53 není klíčový pro tento typ senescence.

4.9 Tvorba fokusů poškození DNA není závislá na p53

Bylo zjištěno, že PML NBs sekvstrují některé proteiny, které se účastní DDR, např. γ H2AX a BRCA1 (Carbone *et al.*, 2002). PML NBs také sekvstruje p53, čímž umožňuje interakci p53 s proteiny, které jej regulují a samy mají úlohu v DDR (např. CHK2, HDM2) (Lauria-Hayon *et al.*, 2003). Hladina γ H2AX byla celkově vyšší za exprese DNp53 (viz obr. 5-10) a proto nás zajímalo, zda porucha funkce p53 má vliv na tvorbu samotných fokusů DNA poškození. V experimentu 5.4 bylo zjištěno, že formace PML NBs není závislá na p53 (viz obr. 5-9). V experimentu 5-2 bylo zjištěno, že TMD vyvolává poškození DNA již za 24 hodin (viz obr. 5-4). K určení potenciálního efektu p53 v DDR na aktivaci γ H2AX po TMD jsme provedli nepřímé imunofluorescenční značení buněk linie U-2-Os p53DD v módu p53on/p53off.

Buňky s doxycyklinem inducibilním systémem byly nasazeny v denzitě 20 000 buněk na cm^2 a v 80% konfluenci ošetřeny TMD. Po 24 hodinách byly zafixovány a

inkubovány s primární králičí protilátkou proti 53BP1 a myší protilátkou proti γ H2AX (sekundární protilátky Alexa Fluor 488 a 568). Jaderné fokusy byly snímány pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP5 (viz 5.2.3).



Obrázek 5-14: *Expres dominantně negativní formy p53 nemá vliv na tvorbu fokusů poškození DNA γ H2AX a 53BP1. Buňky U-2-Os p53DD byly vystaveny TMD po dobu 24 hodin a značeny imunofluorescenčně (γ H2AX zeleně a 53BP1 červeně). Jádra byla vizualizována pomocí DAPI. Obrázky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu, zvětšení 1000x a v případě panelů D a F se zoomem 5,4.*

Na obrázku 5-14 je pomocí nepřímé imunofluorescence demonstrováno, že u buněk s expresí DN formy p53 byly fokusy 53BP1 a γ H2AX srovnatelné jako u buněk s normálním proteinem p53. Protein p53 tedy neovlivňuje formaci fokusů poškození DNA.

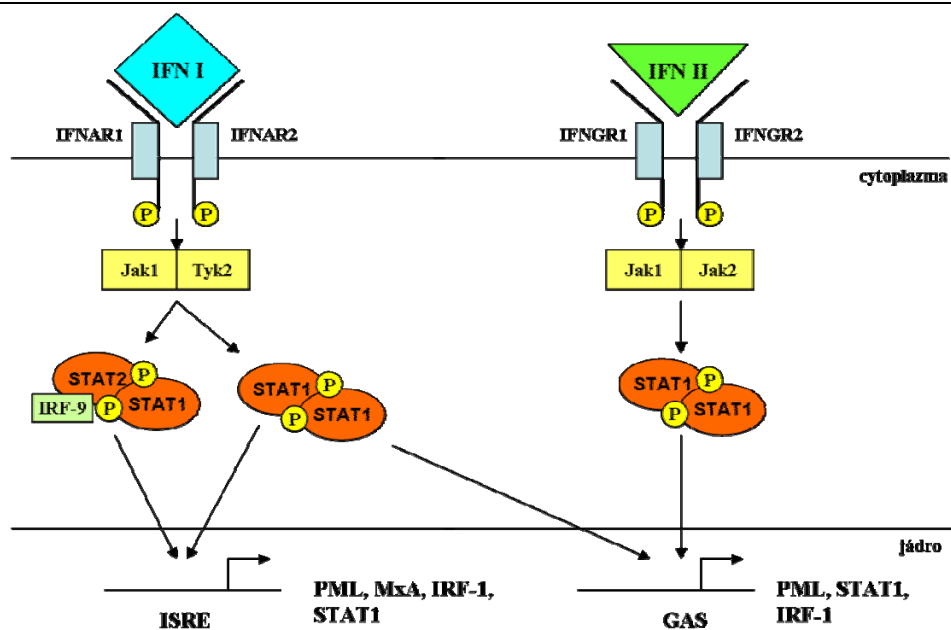
4.10 Buňky v tymidinem-indukované senescenci mají zvýšené hladiny proteinů ze skupiny interferon-stimulovaných genů

Je známo, že exprese genu PML je kromě potenciální účasti p53 (Stanchina *et al.*, 2004) indukovaná interferony typu I a II (Chelbi-Alix *et al.*, 1995; Der *et al.*, 1998). V předchozí práci laboratoře bylo zjištěno, že genotoxické látky BrdU a DMA, které vyvolávají poškození DNA, jsou schopné indukovat formaci jaderných tělísek PML a současnou expresi IFN β (Nováková *et al.*, manuskript v revizi). Protože v experimentech 5.4 a 5.5 nebyla prokázána závislost exprese PML na funkčním p53, cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda je zvýšení indukce PML realizováno skrze indukci interferonové JAK/STAT signální dráhy. Jako kontrolní proteiny pozitivní indukce interferonové dráhy (IFN typu I a II) po TMD byly zvoleny proteiny z rodiny interferonem stimulovaných genů (ISG) IRF-1 a MxA (Der *et al.*, 1998).

IRF-1, transkripční faktor a regulátor exprese genů indukovaných interferony, je pozitivně regulován na úrovni exprese IFN α a IFN γ v odpovědi buňky na virovou infekci (Zhang *et al.*, 2006). IRF-1 je indukován také poškozením DNA v buňkách vystavených působení etoposidu (Pamment *et al.*, 2002). Jeho molekula se váže na ISRE a GAS elementy v oblasti promotorů cílových genů stimulovaných interferony typu I, mezi které patří také STAT (Schindler, C., 1999).

Signální dráha Jak/STAT, které je protein STAT součástí, je drahou aktivovanou po přijetí signálu interferonů typu I i II (Darnell *et al.*, 1994; Wesoly *et al.*, 2007) (viz obr. 5-14).

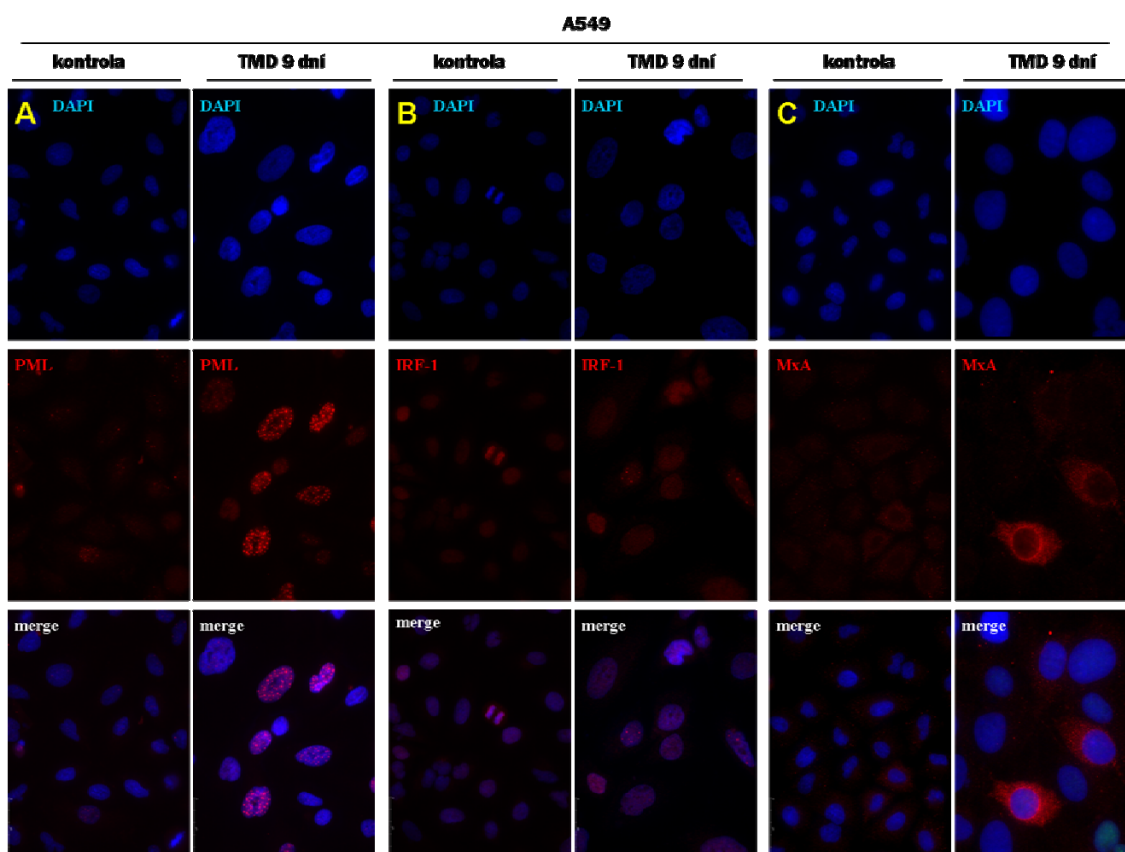
Promotor pro PML rovněž obsahuje element ISRE, který odpovídá na indukci IFN typu I, a navíc i element GAS pro indukci interferony typu II (Chelbi-Alix *et al.*, 1995). Antivirový protein Mx byl popsán u myších buněk a jako gen stimulovaný striktně jen IFN typu I (Staeheli *et al.*, 1986) (viz obr. 5-15) v odpovědi lidských buněk na virovou infekci (Ronni *et al.*, 1995).



Obrázek 5-15: Schéma signální dráhy IFN-Jak/STAT.

Pro průkaz toho, zda jsou MxA a IRF-1 zvýšeny v tymidinem indukované senescenci podobně jako PML (viz obr. 5-6 a 5-8), bylo provedeno nepřímé imunofluorescenční značení pomocí protilátek: myší proti PML, králičí proti IRF-1 a myší proti MxA (sekundární protilátka proti králičí Cy3 a proti myší Alexa 568).

Buňky A549 byly nasazeny v denzitě 20 000 buněk na cm^2 , v 80% konfluenci ošetřeny TMD, který byl kontinuálně přidáván po 9 dní. Poté byly buňky zafixovány a inkubovány s protilátkami. Snímky byly pořízeny pomocí fluorescenčního mikroskopu Leica DM 6000B s černobílou kamerou FX 350. Zvětšení 630x (viz 5.2.3).



Obrázek 5-16: Tymidin vyvolal zvýšení hladiny MxA a IRF-1. Buňky A549 podstoupily indukci senescence 9 denním působením TMD a poté po fixaci nepřímou imunofluorescencí s protilátkami proti PML (A), IRF-1 (B) a MxA (C). DNA byla značena DAPI (modře). Zvětšení 630x.

Na obrázku 5-16 je demonstrováno zvýšení proteinů stimulovaných interferony v tymidinem senescentních buňkách A549. Buňky na obrázku 5-16A zvýšily formaci jaderných tělísek PML (viz rovněž experiment 5.3, obrázek 5-6) a indukovaly cytoplazmatický protein MxA (obr. 5-16C). Jaderný protein IRF-1, který v menším počtu jader vytvořil malé fokusy, byl oproti kontrolním buňkám také zvýšen (obr. 5-16B).

Tymidin indukuje zvýšení hladiny interferonem stimulovaných genů IRF-1 a MxA, což naznačuje aktivaci interferonové dráhy v tymidinem-indukovaných senescentních buňkách.

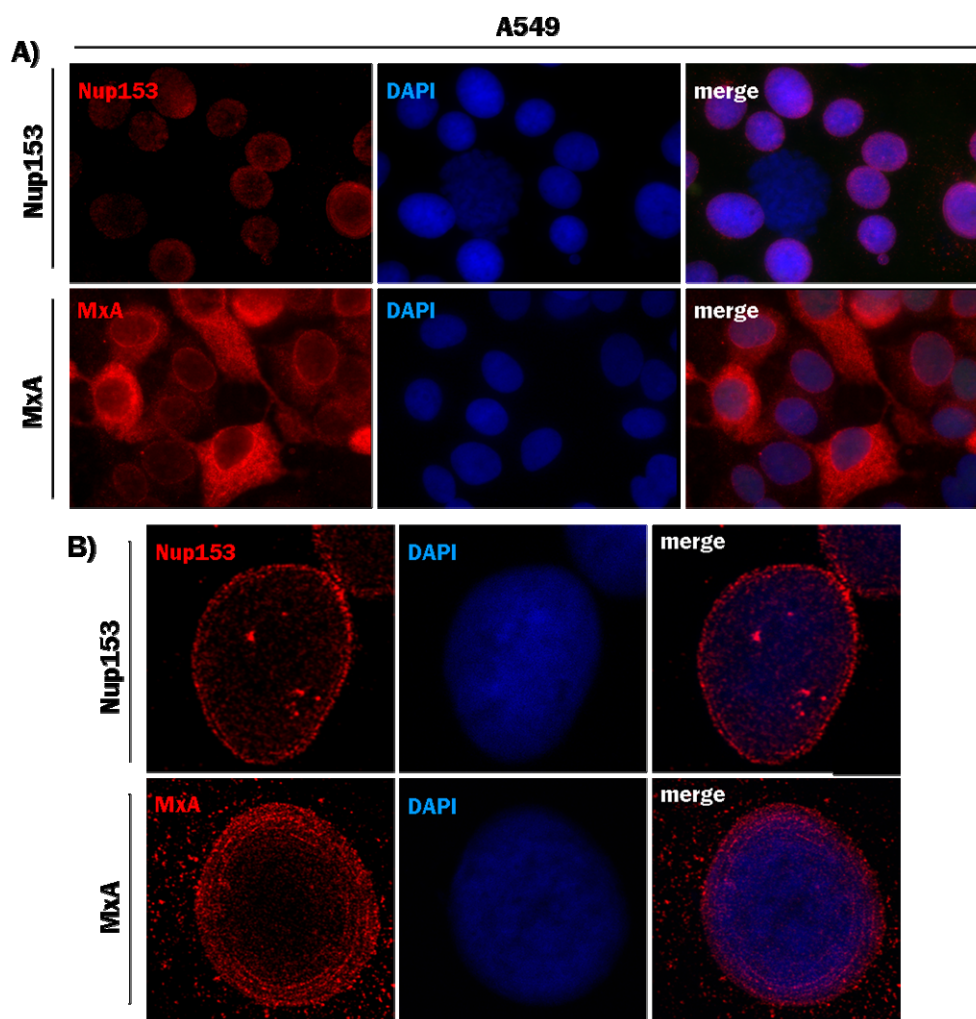
4.11 Buněčná distribuce MxA v senescenci indukované tymidinem

Myší analog Mx1 je po stimulaci IFNs translokován do jádra, kde kolokalizuje s PML NBs (Engelhardt *et al.*, 2001). Lidský MxA je zvýšen u chemicky indukované senescence vyvolané expozicí BrdU (Nováková *et al.*, manuskript v revizi). Cytoplazmatická izoforma PML je za fyziologických podmínek v G1-fázi buněk U-2-Os při obnovení jaderné membrány lokalizována do jaderných pórů tvořených také Nup214 a

Nup98 (Jul-Larsen *et al.*, 2008). V přechodném experimentu 5.9 byl MxA indukován po 9 denním působení TMD (viz obr. 5-16).

Na základě těchto informací jsme se rozhodli prověřit hypotézu, zda-li tymidinem indukovaný cytoplazmatický MxA také interaguje s nukleoporiny. Pro tento účel byly použity buňky A549 a nepřímá imunofluorescence s protilátkami: myší proti MxA a kozí pro Nup98. Protože protilátka proti nukleoporinu nefungovala, zvolili jsme myší protilátku proti Nup153, kterou však nebylo možné použít simultánně s MxA.

Buňky A549 byly nasazeny v denzitě 20 000 buněk na cm^2 a v 80% konfluenci vystaveny 2,5 mM TMD, který byl přidáván kontinuálně po 9 dní. Pak byly buňky zafixovány, jeden vzorek buněk byl inkubován s protilátkou proti MxA a druhý vzorek s protilátkou proti Nup153 (sekundární protilátka Cy3). Po dobarvení byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem Leica DM 6000B s kamerou 350DX a posléze konfokálním mikroskopem Leica TCS Sp5 (viz 5.2.3).



Obrázek 5-17: Buněčná lokalizace MxA u buněk A549. Buňky A549 byly paralelně značeny nepřímou imunofluorescencí na MxA a Nup153. Snímky panelu A byly pořízeny

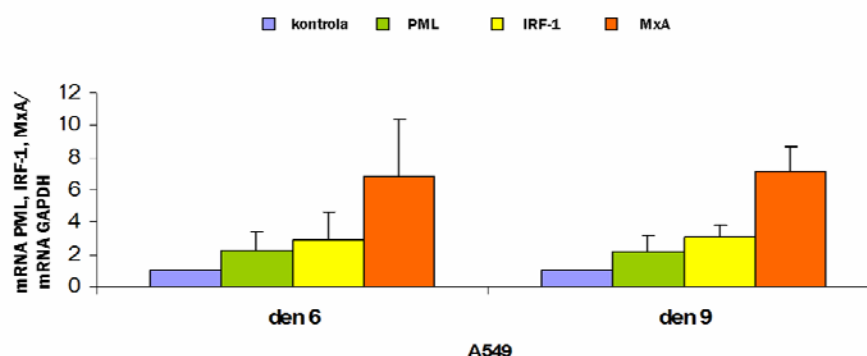
pomocí fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 1000x a fotografie panelu B byly pořízeny konfokálním mikroskopem ve zvětšení 1000x a zoomem 5,4x.

Na obrázku 5-17 je představena lokalizace cytoplazmatického proteinu MxA v oblasti jaderné obálky nápadně připomínající rozložení jaderných pórů detekovaných nukleoporinem 153.

4.12 Tymidin zvyšuje hladinu mRNA PML a IRF-1

Již dříve bylo zjištěno, že protein PML je indukován poškozením DNA po působení UV záření a cisplatinu a to stabilizací na post-transkripční úrovni (Chan *et al.*, 1997). Z výsledků předchozího experimentu 5.8 vyplývá, že TMD indukuje zvýšení MxA (obr. 5-16C) a mírné zvýšení IRF-1 (obr. 5-16B). Protože na obrázcích 5-6 a 5-16A dochází k markantnímu zvýšení formace PML NBs, ale na obrázku 5-8 je hladina proteinu PML změněna minimálně, vyvstává otázka, zda je PML opravdu indukován na úrovni genové exprese nebo jen stabilizován post-translačními modifikacemi, např. SUMOylací, která protein stabilizuje a umožňuje změnu lokalizace do tělísek PML (Duprez *et al.*, 1999). Proto jsme se rozhodli stanovit hladiny mRNA pomocí kvantitativní RT PCR tří interferonem stimulovaných genů PML, IRF-1 a MxA po vystavení buněk TMD.

Buňky byly nasazeny v denzitě 15 000 buněk/cm² a v 75% konfluenci ošetřeny 2,5 mM TMD. Tato látka byla přidávána do média každé tři dny po 6 a 9 dní. Po inkubaci byla izolována celková RNA, po reverzní transkripci byla kvantifikována specifická mRNA genů pro PML, IRF-1 a MxA (viz 5.2.5). Kontrolním genem byl GAPDH.



Obrázek 5-18: Tymidin zvýšil hladinu mRNA pro PML, IRF-1 a MxA. Buňky A549 byly vystaveny po 6 a 9 dní působení TMD. Hladiny mRNA byly kvantifikovány pomocí „reverse transcription quantitative real time PCR“. Kontrolou bylo GAPDH.

Obrázek 5-18 ukazuje hladiny mRNA tří interferonem stimulovaných genů PML. Hladina PML mRNA byla u buněk po 6 denním působení TMD oproti hladině v kontrolních buňkách signifikantně zvýšena 2,3x a v 9. den 2,2x. Hladina IRF-1 se po 6

dnech zvýšila 2,9x a po 9 dnech 3,1x. Hladina mRNA u MxA se po 6 dnech zvýšila 6,8x a po 9 dnech 7,1x.

Dlouhodobé vystavení buněk tymidinu zvyšuje hladiny mRNA interferonem stimulovaných genů PML, MxA a IRF-1, což naznačuje aktivaci interferonové dráhy v předčasně senescentních buňkách.

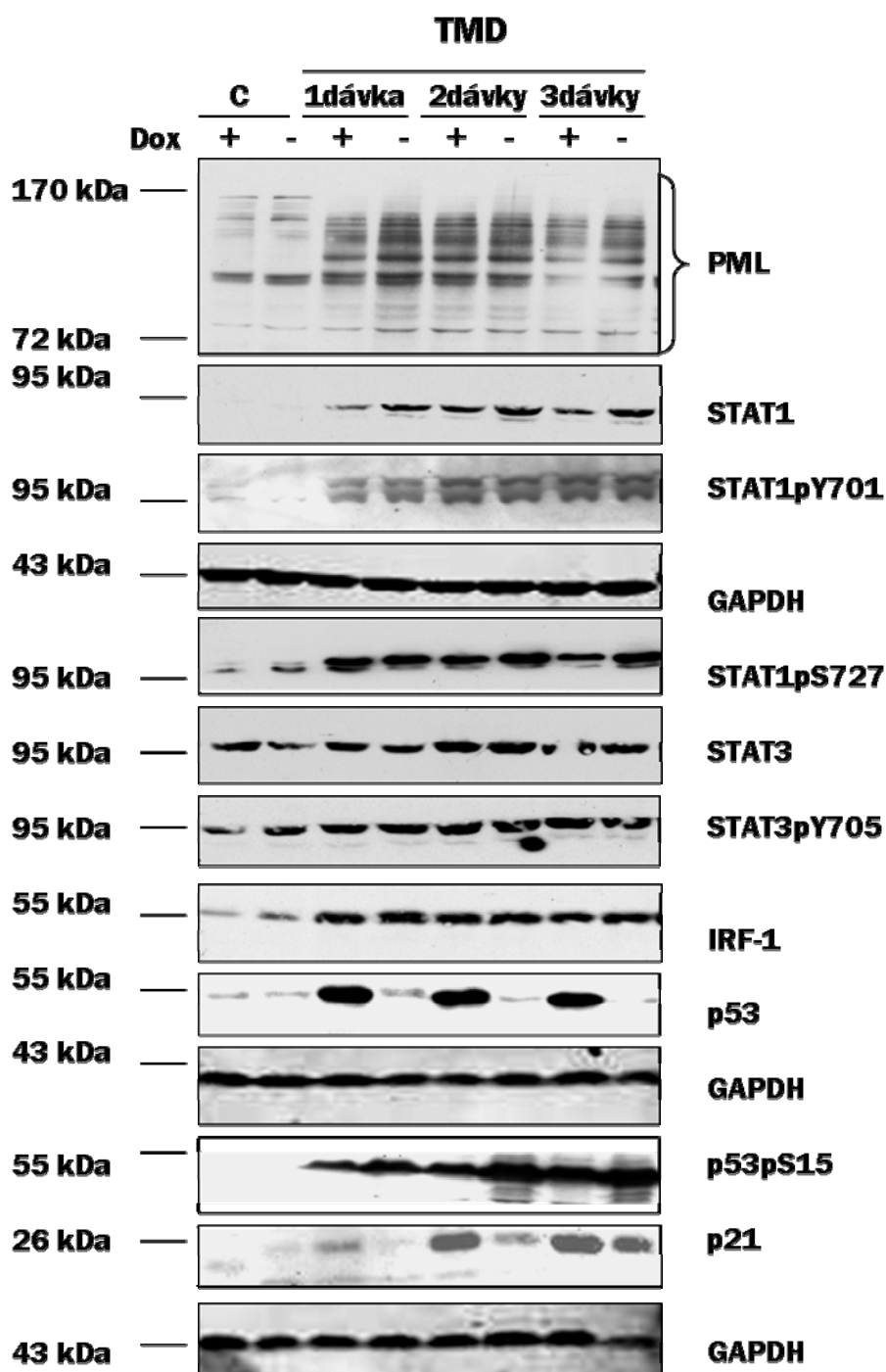
4.13 Tymidin aktivuje komponenty signální dráhy JAK/STAT

Jak bylo zmíněno výše, gen PML je indukován interferony typu I i II (Chelbi-Alix *et al.*, 1995). Hlavní signální kaskádou aktivovanou interferony je Jak/STAT. Tato dráha je aktivována IFNs obou typů (Darnell *et al.*, 1994).

Stejně jako PML i další interferonem stimulovaný gen, MxA, byl zvýšen v tymidinem indukované senescenci (viz obr. 5-18). Tento výsledek naznačuje, že po poškození DNA indukovaném TMD dochází k aktivaci interferonové signální dráhy. IRF-1 je ISG, který může sám o sobě aktivovat signální dráhu Jak/STAT a expresi IFNs typu I buď přímo nebo prostřednictvím exprese proteinu STAT, protože jejich promotory obsahují regulační elementy ISRE a GAS (Schindler, C., 1999).

Protože z výsledků experimentu 5.9 vyplývá, že dochází k zvýšení hladin tří testovaných ISGs (PML, IRF-1 a MxA) na úrovni proteinu (viz obr. 5-16) i na úrovni mRNA (viz obr. 5-18), zajímalo nás, zda je aktivovaná interferonová signální dráha Jak/STAT v tymidinem indukované senescenci. Protože současně stále nelze vyloučit možnost, že na expresi PML se podílí také p53, zajímalo nás, jaká je souvislost mezi indukcí PML, aktivitou Jak/STAT signalizace a funkcí p53. K zodpovězení těchto otázek jsme použili opět model U-2-Os p53DD buněk ošetřovaných TMD a imunoblotovou analýzu s detekcí PML a markerů aktivované signální dráhy Jak/STAT (STAT1 a STAT3).

Buňky byly nasazeny v denzitě 20 000 buněk na cm² a v 85% konfluenci ošetřeny TMD. Po 6 denním působení této látky v násobném dávkování, použitém v experimentu 5.4 podle schématu 5-7, byly buňky lyzovány a proteiny rozděleny pomocí SDS PAGE. Proteiny byly poté přeneseny na membrány, které byly inkubovány s primárními protilátkami: králičí proti-PML, králičí proti-STAT1-fosfo-Y701, králičí proti-STAT3, králičí proti-IRF-1, myší proti-STAT1, myší proti-STAT1-fosfo-S727, myší proti-STAT3-fosfo-Y705, myší proti-p21, králičí proti-p53, králičí proti-p53-fosfo-S15 a myší proti-GAPDH. Imunoreaktivní signál byl detekován pomocí chemiluminiscence expozicí na rentgenový film (viz 5.2.4).



Obrázek 5-19: Závislost tymidinem zprostředkované aktivace STAT1 a STAT3 na expresi dominantně negativní formy p53. Imunoblotová analýza aktivace interferonem stimulovaných genů PML, STAT1, IRF-1 a aktivace STAT1 - tyrosinové (STAT1pY701) a serinové fosforylace STAT1 (STAT1pS727) vzhledem k hladinám p53, jeho poškozením DNA aktivované formy p53pS15 a p21.

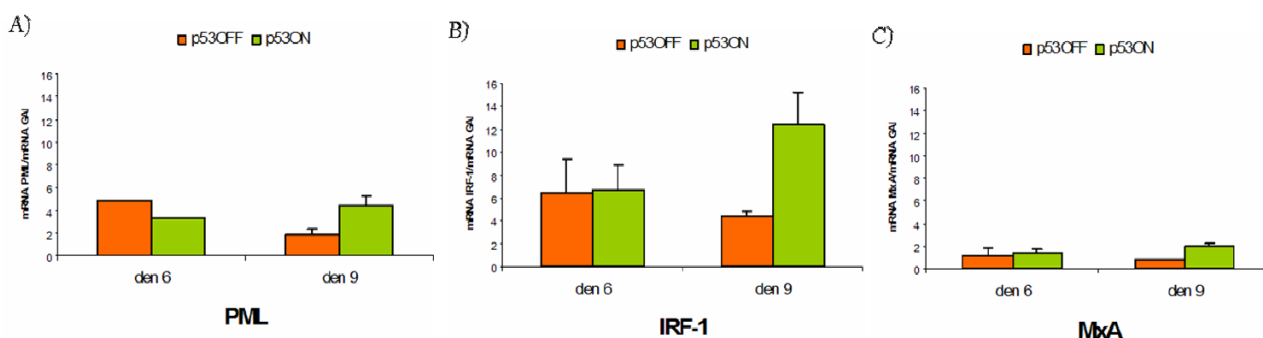
Z výsledků imunoblotové analýzy na obrázku 5-19 vyplynulo, že působení TMD indukovalo vedle zvýšení PML a IRF-1 také zvýšení celkové hladiny STAT1 a jeho fosforylací aktivovaných forem STAT1pS727 a STAT1pY701 již po jedné dávce, přičemž tato exprese přetrvala až do 6. dne od počátku působení tymidinu. Hladina celkového

STAT3 se nezměnila, ale jeho aktivovaná forma STAT3pY705 byla po TMD mírně indukována. p21 bylo zahrnuto pro kontrolu funkce dominantně negativní formy p53.

Ze srovnání jednotlivých proteinů Jak/STAT po indukci tymidinem při současné funkční ablaci p53 vyplynulo, že pouze STAT1 a jeho aktivovaná forma STAT1 pS727 byly výrazněji zvýšeny u buněk s expresí DNp53 než u buněk s normální expresí p53. Ostatní analyzované proteiny neukázaly žádný rozdíl hladin s ohledem na expresi DNp53. Jako v předchozích experimentech, poškození DNA vyvolané TMD bylo doprovázeno zvýšenou hladinou p53 a jeho efektoru p21 především v buňkách s intaktním p53.

Pro ověření aktivity signální dráhy Jak/STAT1 naznačené na obr. 5-19 v U-2-Os p53DD jsme se rozhodli stanovit hladiny mRNA tří vybraných interferonem stimulovaných genů PML, IRF-1 a MxA pomocí kvantitativní RT PCR podobně jako v experimentu 5.9 na A549 (viz 5.2.5.2).

Buňky byly nasazeny v denzitě 15 000 buněk na cm^2 a v 75% konfluenci ošetřeny TMD, který byl přidáván po 6 a 9 dalších dní. Po té byla izolována totální RNA a kvantifikována pomocí qRT PCR (viz 5.2.5). Kontrolním genem byla GAPDH.



Obrázek 5-20: *Efekt tymidinu na hladiny mRNA interferonem stimulovaných genů PML, IRF-1 a MxA. Buňky U-2-Os p53DD Dox+ (p53ON) a Dox- (p53OFF) po 6 a 9 denním působení TMD. Hladiny mRNA byly stanoveny pomocí qRT PCR.*

Z dat kvantitativní RT PCR na obrázku 5-20 vyplývá, že TMD po 6 dnech u buněk U-2-Os p53DD mírně ale signifikantně zvýšil transkripci PML a IRF-1 (obr. 5-20A, B), kdežto neměl efekt po stejné době působení na hladinu mRNA u MxA. Jeho hladina byla téměř dvakrát zvýšena teprve po 9 dnech působení TMD a to pouze u buněk bez p53 (obr. 5-20C).

Lze uzavřít, že TMD indukoval dlouhodobé zvýšení hladiny proteinu STAT1 a jeho aktivovaných forem STAT1pS727, STAT1pY701, k čemuž dostačovalo jednorázové

vystavení buněk tymidinu. Fosforylace STAT1 na serinu 727 se zdá být ovlivněna expresí dominantně negativní formy p53, což naznačuje účast p53 v aktivaci STAT1.

Kromě toho tymidin indukoval zvýšení hladin mRNA pro PML a IRF-1 v U-2-Os p53DD podobně jako v buněčné linii A549. Avšak překvapivě na rozdíl od buněk A549, ke zvýšení hladiny MxA mRNA v U-2-Os p53DD došlo mírně a to pouze za současné exprese dominantně negativní formy p53.

5 Závěr

- Dlouhodobé vystavení buněk TMD v koncentracích používaných k synchronizaci buněk vyvolává neopravitelné poškození DNA, doprovázené perzistentní odpovědí na poškození DNA, indukci inhibitorů buněčného cyklu, zástavou buněčného cyklu a rozvojem buněčné senescence.
- Tymidinem indukovaný senescentní fenotyp je doprovázen přítomností typických markerů buněčné senescence – indukci nádorového supresoru PML, zmnožením jaderných tělísek PML, zvýšením aktivity se senescencí asociované β -galaktosidázy.
- K expresi PML dochází pravděpodobně na úrovni transkripce genu PML. Jak rozvoj tymidin-indukované senescence, tak transkripce genu PML pravděpodobně nejsou závislé na aktivaci p53.
- Vedle PML jako jednoho ze skupiny interferonem stimulovaných genu, TMD stimuluje expresi dalších ISG - MxA a IRF-1.
- Tymidinem indukovaná exprese ISG je doprovázena aktivací STAT1.

6 Diskuze

Vývoj nových a efektivnějších chemoterapeutik, které by způsobovaly nižší vedlejší účinky na nenádorové buňky organismu, je v současnosti mimo jiné realizován testováním různých derivátů genotoxických látek, ať již přírodních nebo syntetických, na růst populace buněk izolovaných přímo z nádorů. K porozumění deregulace proliferace a apoptózy, jakožto důsledku mutací přispívajících k transformaci, je třeba objasnit mechanismy těchto procesů předně za fyziologických podmínek u normálních buněk. Nádorové buňky mají však oproti primárním liniím několik výhod, především možnost dlouhodobé kultivace. K nevýhodám použití nádorových linií patří zejména deregulace genové exprese vznikající v důsledku neustále probíhající reorganizace jejich nestabilního genomu.

Buněčná senescence je považována za jeden z mechanismů onkogenní bariéry (Bartková *et al.*, 2006; Collado *et al.*, 2007; Di Micco *et al.*, 2006; von Zglinicky *et al.*, 2005). Kromě celé řady fenotypických změn je také spojena se sekrecí prozánětlivých cytokinů/chemokinů jako je IL-1, IL-6 a IL-8 (Kuilman *et al.*, 2008; Campisi *et di Fagagna*, 2007), mezi které se řadí nově také interferony produkované u specifického typu předčasné senescence indukované např. BrdU a distamycinem A (Nováková *et al.*, manuskript v revizi). Interferony se uplatňují hlavně v antivirové ochraně buňky, ale fungují také jako silné nádorové supresory využitelné v terapii některých malignit, např. melanomů (Jonash *et Haluska*, 2001). Během této diplomové práce nalezená aktivace interferonových drah během senescence indukované TMD podporuje hypotézu jak bariérového efektu senescence, tak možnost nálezu terapeuticky využitelných látek vyvolávajících buněčnou senescenci s produkcí nádorově supresivních interferonů.

Tato diplomová práce předkládá experimenty vypracovávané především na modelech stabilních nádorových linií a snaží se charakterizovat tymidinem indukovanou předčasnou senescenci s bližším zaměřením na expresi vybraných nádorových supresorů, které jsou markery buněčné senescence. Dále popisuje indukci interferonové signální dráhy doprovázené aktivací interferon stimulovaných genů.

6.1 Indukce předčasné buněčné senescence po TMD

Předčasná buněčná senescence je popisována jako trvalá zástava buněčného cyklu, která je indukována poškozením DNA, ať již přímým při chemicky indukované senescenci (Blažková *et al.*, 2009; Janderová-Rossmeislová *et al.*, 2007) nebo jako důsledek aberantní aktivace onkogenů (Bartková *et al.*, 2006; Collado *et al.*, 2007; Di Micco *et al.*, 2006; Serrano, *et al.*, 1997).

Tymidin je látka buňkou přirozeně syntetizovaná a dosud nebyl vysloven předpoklad, že by mohla poškozovat DNA, které je součástí. Působení exogenního TMD je příčinou změny poměru buněčných zdrojů/zásob dNTPs (deoxyribonucleotides), což inhibuje ribonukleotid reduktázu, která katalyzuje formaci prekurzorů DNA. Buňka vzhledem k nedostatku dNTPs následně zastavuje buněčný cyklus na přelomu fází G1 a S (Bjursell *et Reichard*, 1973). TMD se proto ve výzkumu hojně používá pro řízenou synchronizaci buněčného cyklu u proliferujících buněk. Principem této synchronizace je působení dvou dávek: Jedna dávka (24 h) inhibuje cyklus populace buněk v G1-fázi, po jejím odmytí a uvolnění blokace cyklu (12 h), druhá dávka zastavuje cyklus v S-fázi („double thymidine block“) (Engstrom *et Kmiec*, 2007; Shedden *et Copper*, 2002).

Protože bylo popsáno, že TMD použitý k indukci zvýšení opravných mechanismů DNA během S-fáze také vyvolává u buněk karcinomu tlustého střeva (DLD-1) morfologické změny připomínající buněčnou senescenci (Engstrom *et Kmiec*, 2007), zajímalo nás, 1) zda tyto změny vyvolá také u jiných nádorových linií, 2) zda vyvolává poškození DNA nutné pro rozvoj buněčné senescence a 3) zda se skutečně jedná o buněčnou senescenci. Pro tento účel jsme použili TMD v koncentraci 2,5 mM, o které bylo již dříve zjištěno, že vyvolává chromozomální fragilitu (Jacky *et al.*, 1983).

Paralelně s kontrolní indukcí předčasné senescence vyvolané analogem tymidinu BrdU (Michishita *et al.* 1997; Nováková *et al.*, manuskript v revizi), jsme zjistili, že TMD při dlouhodobém působení také indukuje permanentní zástavu buněčného cyklu doprovázenou morfologickými změnami typickými pro senescentní fenotyp a to jak u linie karcinomu plic A549, tak u linie karcinomu děložního čípku HeLa (viz experiment 5.1, obr. 5-1). Tento efekt byl podpořen pozitivní histochemickou detekcí enzymu β -galaktosidázy (viz obr. 5-2A), jejíž zvýšená exprese je typická pro buněčnou senescenci (Dimri *et al.*, 1995). Obě vybrané linie se tedy v reakci na nadbytek TMD ukázaly být dobrým modelem pro navození chemicky-indukované předčasné senescence.

Protože je TMD pouze nepřímým inhibitorem ribonukleotid reduktázy, zajímalo nás také, zda bude mít stejný efekt na indukci senescence ve srovnání s přímým inhibitorem ribonukleotid reduktázy, hydroxymočovinou (Yogev *et al.*, 2006). Protože tato látka inhibuje u buněk syntézu DNA i proteinů, je také využívána v chemoterapii (mimo jiné v léčbě karcinomu děložního čípku) (Saban *et Bujak*, 2009). Vedlejším efektem působení hydroxymočoviny je produkce ROS, které vznikají jako důsledek nestability molekuly a poškozují DNA (Kuong *et Kuzminov*, 2009). Zjistili jsme, že TMD vyvolává u buněk HeLa senescenci obdobně jako hydroxymočovina (viz obr. 5-2B).

Protože se pro optimalizaci indukce senescence vyvolané expozicí genotoxickým látkám používá strategie dlouhodobého působení látek s nejnižším nutným cytotoxickým účinkem, testovali jsme nižší i vyšší koncentrace TMD: 1 mM, 2,5 mM a 5 mM. Po 9 dnech bylo zjištěno, že 1 mM TMD na indukci senescence nestačí, což bylo nepřímo zjištěno již dříve (Engstrom *et al.*, 2007). Při koncentracích 2,5 a 5 mM vyvolal senescenci srovnatelně a ani 5 mM koncentrace TMD nevedla k buněčné smrti, ale k rozvoji senescence (data neukázána). Pro další experimenty byl proto použit TMD v koncentraci 2,5 mM.

6.2 Tymidin vyvolává perzistentní odpověď na poškození DNA

Chemicky indukovaná senescence je vyvolána poškozením DNA, které indukuje mechanismy DDR (viz 2.2). DDR zahrnuje aktivaci inhibitorů buněčného cyklu a to jak proapoptotických, tak antiapoptotických mechanismů v závislosti na typu a koncentraci použité látky.

Protože nebylo dosud přímo prokázáno, že TMD poškozuje DNA (Engstrom *et al.*, 2007), působili jsme na buňky TMD po 24 hodin a k detekci poškození DNA jsme použili nepřímou imunofluorescenční analýzu s využitím markerů DSB - aktivovaného H2AX (γ H2AX) a 53BP1 (Kruhlák *et al.*, 2006; Rogakou *et al.*, 1998). V tomto experimentu (5.2) bylo zjištěno, že TMD skutečně indukuje aktivaci a relokizaci γ H2AX a 53BP1 (tvorbu fokusů) prezentující poškození DNA (viz obr. 5-4) srovnatelně s poškozením, které indukovaly vybrané genotoxické látky, cisplatina a hydroxymočovina, používané v chemoterapii (viz 2.3.2.4 a obrázek 5-3F,G).

Tvorba fokusů γ H2AX a 53BP1 byla dříve popsána jako reakce na vznik DSB (Ward *et al.*, 2003). TMD se váže do ssDNA odhalené v místech aktivní replikace DNA během S-fáze, kdy při zvýšené koncentraci způsobuje vznik mutací typu mismatch, které zpomalují až zastavují replikaci DNA (Engstrom *et al.*, 2009). TMD inhibicí replikace vyvolává replikační stres buněk, pravděpodobně kolapsem zastavených replikačních vidlic. Tuto hypotézu podporuje zjištění, že TMD inhibuje buněčný cyklus převážně v S-fázi (40-60% buněk) a méně v G1-fázi (30-50%) (Lavoie *et al.*, 2001). TMD svým působením aktivuje opravné mechanismy chybného párování bází (MMR viz 2.1.1.1) (Engstrom *et al.*, 2009), které nejsou pod správou intra-S-fázního kontrolního bodu indukovaného exogenním poškozením DNA, ale replikačního kontrolního bodu indukovaného chybami v aktivních replikonech (viz 2.4.2) (Bartek *et al.*, 2004). Efektivita nápravných mechanismů rozpadlých replikačních vidliček je řízena skrze aktivaci ATR-CHK1 a jejich

substrátem 53BP1 (Brosh *et al.*, 2007). ATR také přímo aktivuje γ H2AX (viz 2.2.1.3.2) (Forey *et al.*, 2003). γ H2AX však může být také aktivován DSB, a ač jsme nepřinesli přímý průkaz, nelze vyloučit, že TMD vyvolává DSB obdobně jako jiný induktor MMR, 6-thioguanin (Yan *et al.*, 2003).

Na základě řady studií se předpokládá, že hlavní příčinou udržení senescentního stavu je přetrvání DDR vyvolané neopravitelným poškozením DNA (Nováková *et al.*, manuskript v revizi; Sedelníková *et al.*, 2004), která brání návratu k normálnímu průběhu buněčného cyklu skrze perzistentní aktivaci signálních drah p53-p21 a pravděpodobně i p16-pRB (viz 2.4) (Pascal *et al.*, 2005). Protože jsme při experimentu 5.2 rovněž zjistili, že po působení opakovaných dávek TMD došlo ke zvýšení počtu míst poškození DNA, a abychom rozlišili, zda se jedná opravdu o perzistentní aktivaci DDR či jen o obnovovaný vznik nových lézí, rozhodli jsme se otestovat možnost perzistentní aktivace DDR po relativně krátkodobém působení TMD. Pomocí imunoblotové analýzy (viz obr. 5-5) jsme zjistili, že DDR přetrvává 10 dní i v případě jediné 3 dny trvající dávky TMD. Z analýzy také vyplynulo, že TMD vyvolává stabilizaci a aktivaci p53 specifickou pro odpověď na poškození DNA (p53 aktivovaný na S15) (Zhang *et al.*, 2005) (viz 2.2.1.4.1), tato aktivace byla následována zvýšením hladin p21, transkripčního cíle aktivovaného p53 (Vogelstein *et al.*, 2004). p21 blokuje buněčný cyklus inhibicí komplexu cycE/CDK2 nezbytného pro přestup mezi fázemi G1 a S (viz 2.4). Zjistili jsme, že po celých 10 dní od jedné dávky TMD přetrvává i aktivace γ H2AX, substrátu aktivované ATM, což naznačuje buď dlouhodobou aktivaci této kinázy přetrvávajícím/neopravitelným poškozením nebo absenci mechanismů odpovědných za obnovení („recovery“) signalizace po opravě lézí (viz 2.3.2.1). Analogicky reparovatelná dávka ionizujícího záření vyvolá aktivaci γ H2AX a relokizaci do míst poškození, které zmizí do 10 h, kdežto nereparovatelná dávka ionizujícího záření indukuje rapidní relokizaci γ H2AX již do 3 minut, fokusy poškození DNA se později zvětšují a zůstávají intaktní po několik dní až měsíc (Rodier *et al.*, 2009). Absence typického senescentního fenotypu a obnova proliferace buněk vystavených jedné dávce TMD (data neukázána) naznačuje, že míra poškození DNA je pro indukci senescence za těchto podmínek podprahová. Pro indukci senescence je třeba delšího působení TMD. To je v souladu se studií Engstromové a Kmiece, kteří popsali, že na indukci senescence pomocí TMD je třeba jeho jednodenní předpůsobení a další tři dny působení (celková délka působení 4 dny) (Engstrom *et al.*, 2007). My jsme v předchozím experimentu zjistili, že senescence je indukována také pouze po kontinuální

inkubaci trvající minimálně 6 dní. Rozdíl mezi těmito skutečnostmi lze vysvětlit odlišnostmi buněčného typu, který byl použit v obou studiích.

6.3 Indukce PML v tymidinem-indukované senescenci

Počet tělísek PML se zvyšuje spolu s hladinou PML jak u replikační senescence normálních buněk (Robles *et al.*, 1999), tak u senescence indukované aktivovanými onkogeny (Ferbeyre *et al.*, 2000) i chemicky-indukované senescence normálních i nádorových linií (Bischof *et al.*, 2001; Janderová-Rossmeislová *et al.*, 2007). Pro ověření, že je tato pro senescenci charakteristická struktura expandována v nádorových liniích i během senescence indukované tymidinem, jsme vystavili buňky A549 dlouhodobému působení TMD a posléze detekovali nepřímou imunofluorescencí množství jaderných tělísek PML. Zjistili jsme, že TMD u těchto buněk indukoval formaci PML NBs již po 6 dnech (viz obr. 5-6B) a že se jejich počet zvýšil po dalších třech dnech působení TMD (obrázek 5-6C). Expanse jaderného kompartmentu PML je tedy charakteristickým rysem i buněčné senescence vyvolané tymidinem.

Na základě dat popisujících zvýšení exprese proteinu PML po poškození DNA (Pearson *et al.*, 2001), jsme se rozhodli zjistit, zda k indukci PML NBs po TMD a zvýšení hladiny proteinu PML dojde i u buněk vystavených pouze jedné ve srovnání s opakovanými dávkami TMD. Zjistili jsme, že TMD zřejmě zvyšuje jak hladinu exprese, tak post-translační modifikace PML, a to již po jedné dávce (viz obr. 5-8B). Narůst hladiny méně mobilních (vysokomolekulárních) forem PML naznačuje intenzivní post-translační modifikace PML (viz obr 5-8A). Ač povaha těchto modifikací nebyla námi testována, v úvahu přichází vznik polySUMOylovaného PML. SUMOylace PML je nezbytná pro oligomerizaci proteinu bez které nedojde k formaci tělísek PML (viz 2.7.1) (Duprez *et al.*, 1999). Z dat naší laboratoře je zřejmé, že během chemicky indukované senescence dochází ke zvýšení polySUMOylovaných SUMO-2 a SUMO-3 forem proteinů, které jsou vyvolané pravděpodobně deregulací SUMOylačních reakcí během chemicky indukované senescence (Kopová *et al.*, nepublikovaná data). V tomto ohledu je zajímavé, že ektopická exprese SUMO-2 a SUMO-3 a nikoliv SUMO-1 (SUMO-1 netvoří polyřetězce, Chang *et al.*, 1995) je schopna navodit předčasnou buněčnou senescenci (Li *et al.*, 2006). Bylo zjištěno, že v jaderných těliscích PML dochází k SUMOylacím různých proteinů po poškození DNA SUMO-ligázou PIASy, jejímž substrátem je SUMO-2 a SUMO-3 (viz 2.5.2.4). Zajímavé je, že PIASy je sama o sobě schopna při nadměrné ektopické expresi indukovat senescenci u normálních buněk skrze aktivaci p53 a pRb (Bischof *et al.*, 2006), nicméně bez

doprovodného poškození DNA (Moudrý P., nepublikovaná data). Tyto modifikace zřejmě regulují schopnost PML interagovat s dalšími proteiny, mezi které patří např. remodelátory chromatinu HDAC a CBP/p300 (Luciani *et al.*, 2006), proteiny důležité v transkripci (BLM, topoizomerázy, HP-1) a hlavně proteiny účastníci se odpovědi buňky na poškození DNA (p53, BRCA1, γ H2AX, RP-A) (Carbone *et al.*, 2002).

6.4 p53 nehraje roli v expresi PML indukované TMD

Jaderná tělíska PML jsou považována za senzory chronického poškození DNA, byla popsána jejich kolokalizace s fokusy poškození DNA po ionizující záření (Carbone *et al.*, 2002). Samotná tvorba tělísek v místech poškození je regulována kinázami ATM, CHK2 a ATR. Mimo jiné, p53 je jedním z proteinů, jehož některé post-translační modifikace jsou regulovány PML (viz 2.7.5). p53 interaguje společně s PML a CBP/p300, tato interakce je nezbytná pro acetylaci p53 (Pearson *et al.*, 2000). p53 je rovněž v jaderných tělískách PML fosforylován HIPK2 (Gresko *et al.*, 2009) za účelem jeho stabilizace po poškození DNA vedoucí k transkripční aktivaci a indukci exprese jeho substrátů (viz 2.7.4) (Carbone *et al.*, 2002; Gresko *et al.*, 2009; Pearson *et al.*, 2000). Bylo však navrženo, že by p53 mohl rovněž přímo regulovat samotnou expresi genu PML, protože promotor genu PML nese v prvním intronu p53-responzivní element schopný aktivovat expresi PML z reportérových konstruktů (Stanchina *et al.*, 2004). Protože jsme v experimentu 5.2 zjistili, že TMD vyvolává poškození DNA (viz obr. 5-4), které aktivuje p53 fosforylací na S15 (viz obr. 5-5) a zároveň zvyšuje počet jaderných tělísek PML (viz obr. 5-6), který je doprovázený zvýšenou expresí a/nebo post-translačními modifikacemi proteinu PML (viz obr. 5-8), chtěli jsme také zjistit, zda je formace jaderných tělísek PML závislá na funkčním p53. V tomto experimentu (5.4) jsme pomocí imunofluorescenční analýzy buněk exprimujících deleční mutantu p53 (DNp53), která inhibovala funkci normálního p53, zjistili, že formace jaderných tělísek PML není v tomto experimentálním uspořádání na p53 závislá. Buňky s expresí DN formy p53 tvořily po 6 i 9 dnech srovnatelné množství jaderných tělísek PML jako buňky s funkčním p53 (viz obr. 5-9). Nicméně je stále možné, že narušení funkce p53 tímto způsobem (expresí dominantně negativní formy) je nedostatečné k potlačení všech efektů závislých na p53.

Zajímavou skutečností bylo objevení formace balónovitých typů PML NBs (anglicky popisované jak „PML doughnuts“) (viz 2.7.3.1) u buněk U-2-OS p53DD vystavených tymidinu, které byly lépe pozorovatelné po 6. dni působení TMD pod konfokálním mikroskopem přibližně u 50% jader buněk (viz obr. 5-9). Tyto struktury byly již dříve

popsány v souvislosti se sekvestrací velkého množství proteinů zahrnutých do oprav poškozené DNA (Sterndorf *et al.*, 1997) a remodelace chromatinu (Luciani *et al.*, 2006). Rovněž byl popsán obdobný typ struktur PML asociujících s buněčnými jádřky („PML nucleoli-derived structures“; PML-NDs (Jaderová-Rossmeislová *et al.*, 2007) (viz 2.7.3.1). Balónovité struktury byly pozorovány jen po působení tymidinu jen U-2-Os p53DD, ale ne u buněk A549, pravděpodobně tedy nejsou nezbytné pro rozvoj senescence.

Protože v experimentu 5.3 bylo zjištěno, že TMD indukuje zvýšení jak nemodifikovaných izoform, tak modifikovaných izoform PML (5-8) a zároveň formace PML NBs není ovlivněna funkcí p53 (viz obr. 5-9), chtěli jsme zjistit, jak vypadá hladina PML na úrovni proteinu u buněk v závislosti na expresi DNp53. Z výsledků imunoblotové analýzy vyplývá (viz obr. 5-11), že funkční deplece p53 rovněž nemá vliv na hladinu PML. TMD stejně jako u A549 (viz obr. 5-8) zvýšil hladinu exprese a/nebo množství post-translačních modifikací PML u U-2-Os p53DD, i když mnohem výrazněji a to již po jediné dávce.

Hladina exprese inhibitoru buněčného cyklu p21 byla výrazně nižší u buněk s aktivní expresí DNp53 i po indukci TMD, což potvrzuje závislost indukce p21 na p53 a současně narušení transkripční aktivity p53 expresí DNp53. Exprese DNp53 rovněž vedla ke zvýšení hladiny proteinu γ H2AX, což naznačuje přetrvávání poškození DNA v buňkách s oslabením p53-závislé transkripce genů, které se účastní reparačních mechanismů (Gresko *et al.*, 2009).

6.5 Tymidinem-indukované senescence není závislá na p53

Dříve bylo zjištěno, že v případě ablace p53 u myších buněk nedochází k iniciaci předčasné senescence indukované aktivovaným onkogenem Ras (Ferbeyre *et al.*, 2002). U lidských buněk byl popsán defekt p53, který je spolu s defektem v pRb často spojen s konstitutivním poškozením DNA (DiTullio *et al.*, 2002). Protože TMD v testované koncentraci vyvolal poškození DNA (viz experiment 5.5) i senescenci u buněk A549 a HeLa (viz experiment 5-1), zajímalo nás, zda buňky U-2-Os p53DD bez proteinu p53 podstoupí také senescenci nebo naopak apoptózu.

Z předchozích výsledků vyplývá, že inhibitor buněčného cyklu p16, byl zvýšen u buněk s expresí dominantně negativní formy p53 (viz obr. 5-11), což naznačuje aktivaci p16-pRb dráhy (viz 2.4.1), která kompenzuje absenci funkce dráhy p53-p21 (Collado *et al.*, 2007; Mallette *et al.*, 2007). Dále pomocí histochemické detekce zvýšené exprese β -galaktosidázy byla hodnocena indukce senescence stejně jako v experimentu 5.1. Bylo

nalezeno, že TMD po 9 dnech indukuje senescenci u buněk bez p53 stejně jako u buněk s normálním p53 (viz obr. 5-11) a proto exprese DNp53 nemá vliv na rozvoj tymidinem indukované senescence. Z absence hladiny p21 u buněk bez p53 (viz obr. 5-12) vyplývá, že buňky bez normálního p53 neexprimovaly tento inhibitor komplexu cycE/CDK2, který zastavuje buněčný cyklus v G1-fázi. Protože vzorky p53on a p53off senescely srovnatelně, byl buněčný cyklus u obou inhibován stejně, což lze u buněk p53off vysvětlit zástupnou aktivací jiného inhibitoru buněčného cyklu, např. p16, jak uvedeno výše.

Tyto nálezy naznačují, že p53 není klíčový či nezastupitelný i pro tento typ senescence a jsou v souladu s tím, že u lidských buněk je známa kompenzace/spolupodíl Rb dráhy, které je třeba inhibovat obě najednou, aby se docílilo ablace senescence (Mallette *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2004).

6.6 Tvorba fokusů poškození DNA není závislá na p53

Bylo zjištěno, že PML NBs sekvstrují některé proteiny, které se účastní DDR, např. γ H2AX a BRCA1 (Carbone *et al.*, 2002). PML NBs také sekvstruje p53, zprostředkovává jeho post-translační modifikace a umožňuje interakci p53 s proteiny, které jej regulují a samy mají úlohu v DDR (např. CHK2, HDM2) (Lauria-Hayon *et al.*, 2003). Hladina γ H2AX byla celkově vyšší za exprese DNp53 (viz obr. 5-11) a proto nás zajímalo, zda porucha funkce p53 má vliv na tvorbu samotných fokusů DNA poškození. V experimentu 5.4 bylo zjištěno, že formace PML NBs není závislá na p53 (viz obr. 5-9) a v experimentu 5.2 bylo zjištěno, že TMD vyvolává poškození DNA již za 24 hodin (viz obr. 5-4).

Z výsledků imunofluorescenční analýzy použité k určení potenciálního efektu p53 v DDR na aktivaci γ H2AX po TMD u buněk U-2-Os p53DD vyplývá, že exprese DNp53 nemá vliv na tvorbu fokusů poškození DNA γ H2AX a 53BP (viz obr. 5-14). Protein p53 neovlivňuje formaci fokusů poškození DNA vyvolané TMD.

Tento náleznaznačuje, že aktivace jak 53BP1, tak γ H2AX, není závislá na funkci p53, což je v souladu s dnešním pohledem, že p53 je efektoem působícím v odpovědi na poškození DNA distálně („downstream“) vzhledem k procesům aktivujícím tvorbu fokusů poškození DNA.

6.7 Indukce interferonem stimulovaných genů v senescenci indukované tymidinem

Je známo, že exprese genu PML je kromě potenciální účasti p53 (Stanchina *et al.*, 2004) indukovaná interferony typu I a II (Chelbi-Alix *et al.*, 1995; Der *et al.*, 1998; Stadler

et al., 1995). V předchozí práci laboratoře bylo zjištěno, že genotoxické látky BrdU a DMA, které vyvolávají poškození DNA, jsou schopné indukovat formaci jaderných tělísek PML a současnou expresi IFN β (Nováková *et al.*, manuskript v revizi). Protože v experimentech 5.4 a 5.5 nebyla prokázána hypotéza, že je exprese PML závislá na funkčním p53, cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda by zvýšení indukce PML mohlo být realizováno skrze indukci interferonové dráhy (promotor genu PML obsahuje elementy ISRE a GAS, které jsou odpovědné za indukci genu IFN typu I i II) (Der *et al.*, 1998; Chelbi-Alix *et al.*, 1995; Stadler *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2006). Jako kontrolní proteiny pozitivní indukce interferonové dráhy (IFN typu I a II) po TMD byly zvoleny proteiny z rodiny interferonem stimulovaných genů IRF-1 a MxA (Der *et al.*, 1998). Zatímco IRF-1 je indukován oběma typy IFN, exprese MxA je striktně indukována pouze IFN typu I (Staehele *et al.*, 1986). Transkripční faktor IRF-1 se váže na ISRE a GAS elementy v oblasti promotorů cílových genů stimulovaných interferony typu I, mezi které patří také STAT1 (Schindler C., 1999) a působí tak sám o sobě jako pozdní aktivátor interferonové dráhy ve smyslu pozitivní zpětné vazby, především při virových infekcích buňky (Kröger *et al.*, 2002). Signální dráha IFN-Jak/STAT, které je protein STAT1 součástí, je dráhou aktivovanou po přijetí signálu interferonů typu I i II (Darnell *et al.*, 1994; Wesoly *et al.*, 2007) (viz obr. 5-15).

Pro průkaz toho, zda jsou MxA a IRF-1 jako zástupci aktivované dráhy IFN-Jak/STAT zvýšeny v tymidinem indukované senescenci podobně jako PML (viz obr. 5-6 a 5-8), jsme provedli nepřímé imunofluorescenční značení proti PML, IRF-1 a MxA. Buňky A549 (viz obr. 5-16A) zvýšily formaci jaderných tělísek PML a indukovaly cytoplazmatický protein MxA (obr. 5-16C). Jaderný protein IRF-1, který v menším počtu jader vytvořil malé fokusy, byl oproti kontrolním buňkám také zvýšen (obr. 5-16B). Tato data podporuje také výsledek imunoblotové analýzy (viz obr. 5-8) potvrzený zvýšením hladin mRNA (viz experiment 5.10, obr. 5-18). Výsledkem tedy je, že TMD indukuje zvýšení jak MxA, tak IRF-1 a tyto nálezy naznačují aktivaci Jak/STAT dráhy IFNs obou typů v tymidinem indukovaných senescentních buňkách.

6.8 Potenciální lokalizace MxA v oblasti jaderného póru

MxA je cytoplazmatická GTPáza, která se řadí k ISGs indukovaných IFN typu I. MxA tvoří v reakci s virovým nukleokapsidovým proteinem inkluze v perinukleárním prostoru a inhibuje virovou replikaci (Kochs *et al.*, 2004). Bylo také zjištěno, že asociuje s hladkým ER (Acola *et al.*, 2002). MxA je také protein zvýšený u chemicky indukované

senescence vyvolané expozicí BrdU (Nováková *et al.*, manuskript v revizi). V předchozím experimentu 5.9 jsme zjistili, že je MxA indukován i v tymidinem indukované senescenci (viz obr. 5-16). Na rozdíl od lidského striktně cytoplazmaticky lokalizovaného je MxA u myši (Mx1) po indukci interferony lokalizován v jádře, kde kolokalizuje s jadernými tělísky PML. Na základě těchto informací jsme se rozhodli zjistit, jaká je lokalizace MxA po jeho indukci tymidinem. Překvapivě jsme zjistili, že se MxA v některých buňkách hromadí především v cytoplazmě stejně jako po indukci interferony typu I, ale také v oblasti jaderné laminy a to ve strukturách, které připomínaly struktury jaderných pórů (viz obr. 5-17A). Pro ověření hromadění MxA v oblasti jaderného póru jsme použili protilátky specifické proti jedné z komponent jaderného póru, proteinu Nup153, kterou však nebylo možné použít pro dvojité značení stejného preparátu s protilátkou proti MxA. Ač tedy nelze uzavřít, zda MxA je po působení TMD skutečně lokalizován v oblasti jaderného póru, je v této souvislosti zajímavý dřívější nález, že cytoplazmatická izoforma PML je za fyziologických podmínek v G1-fázi buněk U-2-Os při obnovení jaderné membrány lokalizována právě do jaderných pórů tvořených také proteiny Nup214 a Nup98, kde tvoří tělíska složená obou nukleoporinů s PML (Jul-Larsen *et al.*, 2008). Získaná data v této části naznačují, že tymidinem navozené změny v buňce mají některé shodné rysy se stavem navozeným virovou infekcí, čehož si všímají také některé současné studie (Accola *et al.*, 2002).

6.9 Indukce PML v tymidinem indukované senescenci

Jak již bylo uvedeno, hladiny PML jsou zvednuty během různých typů senescence (Ferbeyre *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2000; Janderová-Rossmeislová *et al.*, 2007). Otázkou zůstává, zda pro všechny typy senescence je mechanismus indukce PML stejný. V odpovědi na tuto otázku není jednota a ukazuje se, že různé stimuly vedou ke specifickým mechanismům elevace hladin PML a jaderných tělísek PML. Bylo popsáno, že jaderná tělíska PML jsou tvořena PML, který pouze mění svou lokalizaci a stabilitu na základě post-translačních modifikací, nebo je zvýšena transkripce PML, popř. obojí najednou. Bylo popsáno, že po působení UV-záření nebo cisplatiny je PML indukován pouze post-transkripčně (Chan *et al.*, 1997) (což podporuje hypotézu stabilizace PML namísto exprese *de novo*). Protože jsme v experimentech 5.3 a 5.8 (viz obr. 5-6 a 5-1A) zjistili, že dochází k markantnímu zvýšení formace jaderných tělísek PML po poškození DNA, ale z imunoblotu na obrázku 5-8 nelze jednoznačně uzavřít, zda se mění i hladina proteinu PML, rozhodli jsme se stanovit hladiny PML na úrovni mRNA.

Zjistili jsme, že TMD indukuje zvýšení hladiny PML transkriptu 2,3x (obr. 5-18). Toto relativně malé zvýšení spíše podporuje účast stabilizačních post-translačních modifikací PML. Hladina dalších dvou ISGs se po TMD zvýšila průměrně 3x (u IRF-1) a průměrně 7x (u MxA). Hladina mRNA MxA v případě TMD je však ve srovnání s kombinací BrdU a distamycinu A (dokonce v kratším působení) markantně nižší (do 10 násobku u TMD a až 1700x u BrdU a distamycinu A) (Nováková *et al.*, manuskript v revizi). Mírné ale signifikantní zvýšení hladin mRNA u MxA spolu s aktivací STAT1 (viz níže) naznačuje, že v tymidinem senescentních buňkách dochází k mírné aktivaci interferonů a interferonové odpovědi. Přímý průkaz by přineslo sledování změn hladin IFN β na úrovni mRNA a proteinu, které byly obě zvýšené u předčasné senescence indukované BrdU (Nováková *et al.*, manuskript v revizi).

Z těchto dat vyplývá, že odpovědnost za transkripční indukci PML by mohla mít interferonová signální dráha Jak/STAT. Protože byla až 7x zvýšena transkripce proteinu MxA (obr. 5-18), jenž je indukován striktně IFNs typu I, existuje zde možnost, že by PML mohl být indukován po TMD předně interferony typu I. S cílem prokázat tuto hypotézu jsme se rozhodli sledovat aktivaci vybraných komponent cytokinových drah IFN-Jak/STAT (a také IL6-Jak/STAT, která je rovněž aktivována u buněčné senescence (Catlett-Falcone *et al.*, 1999).

Z výsledků této analýzy na obrázku 5-19 vyplývá, že působení jediné dávky TMD indukuje vedle zvýšení PML a IRF-1 také zvýšení celkové hladiny STAT1 a to markantněji u buněk bez p53. Ačkoliv TMD obě indukované formy STAT1 (S727 a Y701) zvedá, jejich hladina je diferenčně závislá na expresi DNp53. STAT1pY701 je indukován TMD bez závislosti na funkčním p53, kdežto hladina STAT1pS727 naznačuje možnou závislost na p53, jak dokládá vyšší indukce této formy STAT1 u buněk s funkčním p53 ve srovnání s buňkami bez p53. Zvýšení hladin forem STAT1 fosforylovaných na obou aktivačních místech byla dříve prokázána také v chemicky indukované senescenci po BrdU (Nováková *et al.*, manuskript v revizi), ale nebyla prokázána u kamptotecinem indukované senescence, kdy se zvýšila pouze forma S727, ale ne Y701 (Youlyouze-Marfak *et al.*, 2008). Ostatní analyzované proteiny neukázaly žádný rozdíl hladin s ohledem na expresi DNp53.

STAT1 může být aktivován na S727 nezávisle na Y701 skrze několik jiných signálních drah (viz 2.5.2.1.1), např. p38-MAPK (Platanias L.C., 2003), která aktivuje STAT1 na S727, či c-abl po působení kamptotecinu (Youlyouze-Marfak *et al.*, 2008), nebo skrze PI3-K/PKB (Nguyen *et al.*, 2001), PKC (Uddin *et al.*, 2002) či CaMKII (Nair *et al.*, 2002). Vyšší indukce STAT1pS727 napovídá vyšší aktivaci p38-MAPK, která může být

aktivovaná jiným cytokinem indukovaným během buněčné senescence - IL-6 ([Platanias L.C., 2003](#)). Skutečně, vyšší aktivitu dráhy IL6-Jak/STAT také podporuje zvýšení STAT3pY705, který je především aktivován IL-6. Na rozdíl od STAT1pY701, hladina STAT3pY705 byla po TMD zvýšena nezávisle na expresi DNp53.

Oproti výsledkům na buněčné linii A549 (viz obr. 5-18), z dat kvantitativní RT PCR u buněk U-2-Os p53DD (viz obr. 5-20) vyplývá, že TMD rovněž mírně ale signifikantně zvýšil transkripci PML a IRF-1 (obrázky 5-20A, B), ale překvapivě neměl efekt na hladinu mRNA MxA ve stejné koncentraci i délce působení. Hladina MxA byla téměř dvakrát zvýšena až po dalších 3 dnech působení TMD a to pouze u buněk s expresí DNp53 (obrázky 5-20C). Tato data jsou v souladu s nízkou indukcí interferonové odpovědi v linii U-2-Os vůči působení BrdU a distamycinu A, které jsou totiž velmi silnými induktory interferonové odpovědi v buněčných liniích HeLa a A549 ([Nováková *et al.*, manuskript v revizi](#)).

Ve stejné práci bylo zjištěno, že v senescenci indukované BrdU je dráha IFN-Jak/STAT aktivovaná dlouhodobě ([Nováková *et al.*, manuskript v revizi](#)), což podporuje hypotézu, že tato signální dráha je udržována aktivací pozitivních zpětných vazeb ([Shuai K., 2006](#)) podobným těm, které operují při virových infekcích ([Honda *et al.*, 2005](#)). Podle tohoto modelu virem aktivované IRF-7 a 3 řídí expresi interferonů a jejich sekreci, která je schopna ustavit pozitivní regulační smyčku skrze autokrinní/parakrinní mechanismus. Následná neatenuovaná aktivace IFN typu I signální drahou Jak/STAT je výsledkem transkripční indukce genů pro IRFs a IFNs, jejichž produkty pak uzavírají a amplifikují smyčku. Z experimentů této diplomové práce vyplývá, že TMD ve srovnání s působením BrdU v kombinaci s distamycinem A ([Nováková *et al.*, manuskript v revizi](#)) je podstatně slabším induktorem interferonové dráhy. Aktivace STAT3 naznačuje přítomnost jednoho nebo více ligandů (jako je IL-6 nebo EGF) aktivujících tuto dráhu ([Ebong *et al.*, 2004](#)). Překvapivě bylo zjištěno, že IL-6 má klíčovou roli v rozvoji a udržení senescence indukované aberantní expresí RAFE600 ([Kuilman *et al.*, 2008](#)). Toto však nebylo potvrzeno u senescence vyvolané BrdU v kombinaci s distamycinem A ([Nováková *et al.*, manuskript v revizi](#)) a je otázkou, jaká je úloha IL-6 v senescenci indukované tymidinem. Bez ohledu na diskrepanci ohledně kauzální úlohy těchto cytokinů pro navození senescence, autokrinní/parakrinní efekty sekretovaných cytokinů přispívají k vlastnostem senescentních buněk a mohou potenciálně ovlivňovat tkáňové mikroprostředí v okolí senescentní buňky. Buněčná senescence, prezentovaná blokací buněčného cyklu, pravděpodobně potlačuje tvorbu nádorů, protože vývoj nádorových buněk vyžaduje proliferaci. Senescenci indukující stimuly jsou potenciálně onkogenní a nádorové buňky

musí podstoupit mutace, které jim znemožní přejít do senescence. Senescentní buňky v tkáni produkují cytokiny nejen ve změněném poměru než normální buňky, ale také v jiném složení. V poškozené tkáni je narušena synergie působení těchto látek, která ji ovlivňuje (Coccia *et al.*, 1995). Z výsledků našich experimentů vyplývá, že senescentní buňky produkují cytokiny/chemokiny, které působí ve vzájemném antagonistickém vztahu na své okolí, což naznačuje spíše chaotickou roli senescentních buněk v poškozené tkáni. Mezi námi zjištěné produkované antagonisty patří IFN-STAT1 a IL-6-STAT3. Zatímco je IFN antiproliferativní, protizánětlivý, proapoptický, prosenescentní cytokin, jehož aktivita je zprostředkována aktivací nádorového supresoru STAT1, IL-6 podporuje tumorogenezi prorůstovými a prozánětlivými vlastnostmi aktivací onkogenu STAT3 (viz 3.5.1) (Coccia *et al.*, 1995; Norkina *et al.*, 2008; Plataniias L.C., 2003; Turkson *et Jove*, 2000; Zhang *et al.*, 2006).

Perzistentní aktivace STAT3 byla popsána v mnoha onkogeny indukovaných případech senescence (např. c-Eyk, v-Fps, v-Ros, c-Etk, BMX, Lck) (Catlett-Falcone *et al.*, 1999). Tato aktivace je také spojena s transformací onkoviry (viz 2.2), které řízeně i neřízeně indukují Jak i Src kinázy. Protože je pozice STAT3 v signálních kaskádách pod tyrozinovými kinázami, aberantní aktivita STAT3 je klíčový mediátor v tumorogenezi indukovanou těmito kinázami. Naproti tomu byl popsán i mechanismus transformace buňky mimo tyrozinové kinázy a to skrze v-Ras a v-Raf (shrnutí v Turkson *et Jove*, 2000). Druhým důležitým členem STAT rodiny s onkogením potenciálem je STAT5. U něj byla popsána schopnost indukovat transformující fúzi BCR/ABL (Darnell *et al.*, 1994).

Naproti tomu STAT1 ovlivňuje DDR pozitivní regulací exprese mediátorů řídících opravné mechanismy 53BP1 a MDC1 (Townsend *et al.*, 2005), také aktivitu p53 skrze indukci exprese jeho substrátů (inhibitorů buněčného cyklu) a stabilitu p53 skrze inhibici HDM2 (shrnutí v Youlyouz-Marfak *et al.*, 2008). Tento člen rodiny STAT je tedy považován za nádorový supresor, který může být indukován velkou skupinou kaskád obsahujících tyrozinové kinázy, stejně jako STAT3 nebo STAT5.

Signální dráhy Jak/STAT jsou velmi komplexní díky spojení se širokým spektrem jiných kaskád, které regulují základní buněčné procesy (apoptózu, senescenci, proliferaci, odpověď na zánět nebo virovou infekci) a jejich přesné zmapování je otázkou do budoucnosti.

7 Seznam literatury

- Abraham, R.T. (2004): **PI 3-kinase related kinases: “big” players in stress induced signalling pathway.** *DNA Repair*, 3: p. 883-887
- Accola, M.A., Hunag, B., Masri, A.A. & McNiven, M.A. (2002): **The Antiviral Dynamin Family Member, MxA, Tubulates Lipids and Localizes to the Smooth Endoplasmic Reticulum.** *The Journal of Biological Chemistry*, 277(24): s. 21829-21835
- Acosta, J.C., O’Loghlen, A., Banito, A., Raguz, S. & Gil, J. (2008): **Control of senescence by CXCR2 and its ligands.** *Cell Cycle*, 7(19): p. 2956-2959
- Aebi, M., Fäh, J., Hurt, N., Samuel, C.E., Thomis, D., Bazzigher, L., Pavlovic, J., Haller, O. & Staeheli, P. (1989): **cDNA Structures and Regulation of Two Interferon-Induced Human Mx Proteins.** *Molecular and Cellular Biology*, 9(11): s. 5062-5072
- Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B. (2003): **DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation.** *Nature*, 421: s. 499-506
- Bao-Lei, T., Zhong, M.Z., Yi, S., Jie, Y.J., Yan, D., Hua, L., Bin, L., Wei, Z.G. & Xien, S.Z. (2006): **Knocking Down PML Impairs p53 Signaling Transduction Pathway and Suppresses Irradiation Induced Apoptosis Pathway and Suppresses Irradiation Induced Apoptosis.** *Journal of the Biological Chemistry*, 97: 3- 561-571
- Bartek, J. & Lukas, J. (2003): **Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer.** *Cancer Cell*, 3: p. 421-429
- Bartek, J. & Lukas, J. (2006): **Balancing Life-or-Death Decisions.** *Science*, 314: p. 261-262
- Bartek, J., Lukas, C. & Lukas, J. (2004): **Checking on DNA damage in S phase.** *Nature Reviews*, 5: p. 792-804
- Bartek, J., Lukas, J. & Bartková, J. (2007): **DNA Damage Response as an Anti-Cancer Barrier.** *Cell Cycle*, 6(19): p. 2344-2347
- Bartková, J., Hořejší, Z., Koed, K., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., Orntoft, T. Lukas, J. & Bartek, J. (2005): **DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis.** *Nature*, 434: 864-870
- Bartková, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassilliou, L.V.F., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., Takaoka, M., Nakagawa, H., Tort, F., Fugger, K., Johansson, F., Sehested, M., Anderson, C.L., Dyrskjot, L., Ørntoft, T., Lukas, J., Kittas, C., Helleday, T., Halazonetis, T.D., Bartek, J. & Gorgoulis, V.G. (2006): **Onkogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints.** *Nature*, 444: s. 633-637
- Bemiller, P.M. & Lee, L.H. (1978): **Nucleolar changes in senescing WI-39 cells.** *Mechanisms of Ageing and Development*, 8(6): s. 417-427
- Bernardi, R. & Pandolfi, P.P. (2007): **Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukemia nuclear bodies.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: p. 1006-1016
- Besson, A., Dowdy, S.F. & Roberts, J.M. (2008): **CDK inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond.** *Developmental Cell*, 14: p. 159-169
- Best, J.L., Ganiatsas, S., Agarwal, S., Changou, A., Salomoni, P., Shirihai, O., Meluh, P.B., Pandolfi, P.P. & Zon, L.I. (2002): **SUMO-1 Protease-1 Regulates Gene Transcription through PML.** *Molecular Cell*, 10: p. 843-855
- Bischof, O., Kim, S.H., Irving, J., Beresten, S., Ellis, N.A. & Campisi, J. (2001): **Regulation and Localization of the Bloom Syndrome Protein in Response to DNA Damage.** *The Journal of Cell Biology*, 153(2): s. 367-380
- Bischof, O., Kirsh, O., Pearson, M., Itahana, K., Pelicci, P.G. & Dejean, A. (2002): **Deconstruction PML-induced premature senescence.** *The EMBO Journal*, 21(13): p. 2258-2269
- Bjursell G. & Reichard, P. (1973): **Effects of Thymidine on Deoxyribonucleoside Triphosphate Pools and Deoxyribonucleic Acid Synthesis Chinese Hamster Ovary Cells.** *The Journal of Biological Chemistry*, 248(11): p. 3904-3909

- Blažková, H., Krejčíková, K., Vančurová, M., Moudrý, P., Frisan, T., Hodný, Z. & Bartek, J. (...): **Bacterial Intoxication Evokes Cellular Senescence with Persistent DNA Damage and Cytokine Signaling.** *manuskript v revizi*
- Bluyssen, H.A.R., Durbin, J.E. & Levy, D.E. (1996): **ISGF3 γ , p48, a Specificity Switch for Interferon Activated Transcription Factors.** *Cytokine and Growth Factors Review*, 7(1): p. 11-17.
- Borden, K.L.B., Campbell-Dwyer, E.J. & Salvato, M.S. (1997): **The promyelocytic leukemia protein PML has a pro-apoptotic activity mediated through its RING domain.** *FEBS letters*, 418: s. 30-34
- Brachman, E.E. & Kmiec, E.B. (2005): **Gene repair in mammalian cells is stimulated by the elongation of S phase and transient stalling of replication forks.** *DNA Repair*, 4: p. 445-457
- Bringold, F. & Serrano, M. (2000): **Tumor suppressor and oncogenes in cellular senescence.** *Experimental Gerontology*, 35: s. 317-329
- Brosh, R.M. & Bohr, V.A. (2007): Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases. *Nucleic Acid Research*, 35(22): s. 7527-7544
- Burma, S., Chen, B.P.C. & Chen, D.J. (2006): **Role of non-homologous end-joining (NHEJ) in maintaining genome integrity.** *DNA Repair*
- Caldecott, K., Banks, G. & Jeggo, P. (1990): **DNA Double-Strand Break Repair Pathways and Cellular Tolerance to Inhibitors of Topoisomerase II.** *Cancer Research*, 50: s. 5778-5783
- Campisi, J. & di Fagagna, F.A. (2007): **Cellular senescence: when bad things happen to good cells.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: p. 729-740
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B. & Siliciano, J.D. (1998): **Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53.** *Science*, 281: s. 1677-1679
- Carbone, R., Pearson, M., Municcu, S. & Pelicci, P.G. (2002): PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. *Oncogene*, 21: s. 1633-1640
- Catlett-Falcone, R., Dalton, W.S. & Jove, R. (1999): STAT proteins as novel targets for cancer therapy. Signal transducer an activator of transcription. *Current opinion in Oncology*, 11(6): s. 490-496
- Cichowski, K. & Hahn, W.C. (2008): **Unexpected Pieces to the Senescence Puzzle.** *Cell*, 133: p. 958-961
- Clarke, N., Jimenez-Lara, A.M., Voltz, E. & Gronemeyer, H. (2004): **Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signalling to death ligand TRAIL.** *The EMBO Journal*, 23: p. 3051-3060
- Coccia, E.M., Marziali, G., Stellacci, E., Perrotti, E., Ilari, R., Orsatti, R. & Batistini, A. (1995): **Cells Resistant to Interferon- β Respond to Interferon- γ via the STAT1-IRF-1 Pathway.** *Virology*, 211: p. 113-122
- Cook, P.J., Ju, B.G., Telese, F., Wang, X., Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. (2009): **Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions.** *Nature*, 458: s. 591-597
- Collado, M., Blasco, M.A. & Serrano, M. (2007): **Cellular senescence in cancer and ageing.** *Cell*, 130: p. 223-233
- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J. & Elledge, S.J. (1999): **Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response of double-strand breaks.** *Science*, 286: s. 1162-1166
- Cowell, I.G., Sunter, N.J., Singh, P.B., Austin, C.A., Durkacz, B.W. & Tilby, M.J. (2007): **γ H2AX Foci Formed Preferentially in Euchromatin after Ionizing-Radiation.** *Plos One*, 2(10): 1057
- Darnell Jr, J.E., Kerr, I.M. & Stark, G.R. (1994): **Jak-STAT pathway and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.** *Science*, 264(5164): p. 1415-1421
- Dellaire, G. & Bazzet-Jones, D.P. (2007): **Subnuclear Domains and the Cellular Response to DNA damage.** *Cell Cycle*, 6(15): p. 1864-1872
- Dellaire, G., Ching, R.W., Ahmed, K., Jalali, F., Tse, K.C.K., Bristow, R.G. & Bazzet-Jones, D.P. (2006): **Promyelocytic leukemia nuclear bodies behave as a DNA damage sensors whose response to DNA double-strand breaks is regulated by NBS1 and the kinases ATM, CHK2 and ATR.** *The Journal of Cell Biology*, 175(1): p. 55-66

- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R.G. & Silverman, R.H. (1998): **Identification of genes differentially regulated by interferon α , β or γ using oligonucleotide arrays.** *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: s. 15-623-15628
- de Thé, H., Chomienne, CH., Lanotte, M., Degos, L. & Dejean, A. (1990): **The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus.** *Nature*, 347: p. 558-561
- Dierick, J.F., Kalume, D.E., Wenders, F., Salmon, M., Dieu, M., Raes, M., Roepstorff, P. & Toussaint, O. (2002): **Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence.** *FEBS Letters*, 531: s. 499-504
- di Lange, T. (2002): **Protection of mammalian telomeres.** *Onkogene*, 21: s. 532-540
- Dhillon, V.S., Husain, S.A. & Ray, G.N. (2003): **Expression of Aphidicolin-Induced Fragile Sites and Their Relationship Between Genetic Susceptibility in Breast Cancer, Ovarian Cancer, and Non-Small-Cell Lung Cancer Patients.** *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 1: s. 35-45
- Di, X., Bright, A.T., Bellott, R., Gaskins, E., Robert, J., Holt, S., Gewirtz, D. & Elmore, L.W. (2008): **A chemotherapy-associated senescence bystander effect in breast cancer cells.** *Cancer Biology & Therapy*, 7(6): s. 864-872
- di Fagagna, F.A., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., Saretzi, G., Carter, N.P. & Jackson, S.P. (2003): **A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence.** *Nature*, 426: p. 194-198
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., Maestro, R., Pelicci, P.R. & di Fagagna, F.A. (2006): **Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication.** *Nature*, 444(7119): p. 638-642
- Dimri, G.P. (2005): **What has senescence got to do with cancer?** *Cancer Cell*, 7(6): p. 505-512
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M. & Campisi, J. (1995): **A biomarker that identifies senescent human cells in culture and aging skin in vivo.** *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20): p. 9363-9367
- Dimri, G.P., Nakanishi, M., Desprez, P., Smith, J.R. & Campisi, J. (1996): **Inhibition of E2F Activity by the Cyclin-Dependent Protein Kinase Inhibitor p21 in Cells Expressing or Lacking a Functional Retinoblastoma Protein.** *Molecular and Cellular Biology*, 16(6): p. 2987-2997
- DiTullio, R.A., Mochan, T.A., Venere, M., Bartková, J., Sehested, M., Bartek, J. & Halazonetis, T.D. (2002): **53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer.** *Nature Cell Biology*, 4: p. 998-1002
- Dornan, D., Wertz, I., Shimizu, H., Arnott, D., Frantz, G.D., Dowd, P., O'Rourke, K., Koeppen, H. & Dixit, C.W. (2004): **The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator p53.** *Nature*, 429: 86-92
- Draetta, G.F. (1994): **Mammalian G1 cyclins.** *Current Opinion in Cellular Biology*, 6(6): p. 842-846
- Duan, J., Duan, J., Zhang, Z. & Tong, T. (2005): **Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening.** *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37: s. 1407-1420
- Duesberg, P., Stindl, R. & Hehlmann, R. (2000): **Explaining the high mutation rates of cancer cells to drug and multidrug resistance by chromosome reassortments that are catalyzed by aneuploidy.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26): s. 14295-14300
- Duprez, E., Saurin, A.J., Desterro, J.M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M.N., Solomon, E., de Thé, H., Hay, R.T. & Freemont, P.S. (1999): **SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localization.** *The Journal of Cell Science*, 112: s. 381-393
- Durkin, S.G., Arlt, M.F., Howlett, N.G. & Glower, T.G. (2006): **Depletion of CHK1, but not CHK2, induces chromosomal instability and breaks at common fragile sites.** *Oncogene*, 25: s. 4381-4388

- Ebong, S., Chepelinsky, A.B., Robinson, M.L., Zhao, H., Yu, Ch.R. & Egwuagu, Ch.E. (2004): **Characterization of the roles of STAT1 and STAT3 signal transduction pathway in mammalian lens development.** *Molecular Vision*, 10: p. 122-131
- Elmore, L.W., Rehder, C.W., Di, X., McChesney, P., Jackson-Cook, C.K., Gewirtz, G.A., Holt, S.H. (2002): **Adriamycin-induced Senescence in Breast Tumor Cells Involves Functional p53 and Telomere Dysfunction.** *The Journal of Biological Chemistry*, 277(38): s. 35509-35515
- Engelhardt, O.G., Ullrich, E., Kochs, G. & Haller, O. (2001): **Interferon-Induced Antiviral Mx1 GTPase Is Associated with Components of the SUMO-1 System and Promyelocytic Leukemia Protein Nuclear Bodies.** *Experimental Cell Research*, 271: s. 286-295
- Engstrom, J.U. & Kmiec, E.B. (2007): **Manipulation of cell cycle progression can counteract the apparent loss of correction frequency following oligonucleotide-direct gene repair.** *BioMed Central Molecular Biology*, 8(9): 1-16
- Engstrom, J.U., Suzuki, T. & Kmiec, E.B. (2009): **Regulation of targeted gene repair by intrinsic cellular processes.** *BioEssays*, 31: p. 159-168
- Everett, R.D. & Chelbi-Alix, M.K. (2007): **PML and PML nuclear bodies: Implications in antiviral defence.** *Biochimie*, 89: p. 819-830
- Eytan, E., Moshe, Y., Braunstein, I. & Hershko, A. (2006): **Roles of the anaphase promoting complex/cyclosome and of its activator Cdc20 in functional substrate binding.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7): p. 2081-2086
- Fagioli, M., Alcalay, M., Pandolfi, P.P., Venturini, L., Mencarelli, A., Simeone, A., Acampora, D., Grignani, F. & Pelicci, P.G. (1992): **Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms.** *Oncogene*, 7(9): s. 1083-1091
- Ferbeyre, G., Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C. & Lowe, S.W. (2000): **PML is induced by oncogenic Ras and promote premature senescence.** *Genes and Development*, 14: s. 2015-2027
- Ferbeyre, G., Stanchina, E., Lin, A.W., Querido, E., McCurrach, M.E., Hannon, S.W. & Lowe, S.W. (2002): **Oncogenic Ras and p53 cooperate to induce cellular senescence.** *Molecular Cell Biology*, 22(10): s. 3497-3508
- Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P.P., Will, H. & Del Sal, G. (2000): **Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform.** *EMBO Journal*, 19: s. 6185-6195
- Forey, N., Marot, D., Gabriel, A., Randrianarison, V., Carr, A.M., Perricaudet, M., Ashworth, A. & Jeggo, P. (2003): **A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein.** *The EMBO Journal*, 22(11): p. 2860-2871
- Froelich-Ammon, S.J. & Osheroff, N. (1995): **Topoisomerase Poisons: Harnessing the Dark Side of Enzyme Mechanism.** *The Journal of Biological Chemistry*, 270(37): p. 21429-21432
- Fujita, T., Reis, L.F.L., Watanabe, N., Kimura, Y., Taniguchi, T. & Vilček, J. (1989): **Induction of the transcription factor IRF-1 and interferon- β mRNAs by cytokines and activators of second-messenger pathways.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: s. 9936-9940
- Gatei, M., Sloper, K., Sørensen, C., Syljuäsen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B., Bartek, J. & Khanna, K.K. (2003): **Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent Phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in Response to Ionizing radiation.** *The Journal of Biological Chemistry*, 278(17): p. 14806-14811
- Gewirtz, D.A., Holt, S.E. & Elmore, L.W. (2008): **Accelerated senescence: An emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation.** *Biochemical Pharmacology*, 76: p. 947-957
- Goldberg, M., Stucki, M., Falck, J., D'Amours, D., Rahman, D., Pappin, D., Bartek, J. & Jackson, S.P. (2003): **MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint.** *Nature*, 421: s. 952-956
- Gonzalez, V.M., Fuertes, M.A., Alonso, C. & Perez, J.M. (2001): **Is Cisplatin-Induced Cells Death Always Produced by Apoptosis?** *Molecular Pharmacology*, 59: s. 657-663
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V.F., Karakidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., DiTullio, R.A., Kastrinakis, N.G., Levy, B., Kletsas, D., Yoneta, A., Herlyn, M., Kittas, C. &

- Halazonetis, T.D. (2005): **Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions.**, 434(7035): s. 907-913
- Greshko, E., Ritterhoff, S., Sevilla-Perez, J., Roscic, A., Fröbuis, K., Kotevic, I., Vichalkovski, A., Hess, D., Hemmings, B.A. & Schmitz, M.L. (2009): **PML tumor suppressor is regulated by HIPK2 mediated phosphorylation in response to DNA damage.** *Oncogene*, 28(5): p. 698-708
- Griffith, J.D., Lindsey-Boltz, L.A. & Sancar, A. (2002): **Structures of the human Rad17-replication factor C and checkpoint Rad 9-1-1 complexes visualized by glycerol spray/low voltage microscopy.** *The Journal of Biological Chemistry*, 277: s. 15233-15236
- Gough, D.J., Levy, D.E., Johnstone, R.W. & Clarke, C.J. (2008): **IFN γ signaling – Does it mean JAK-STAT?** *Cytokine & Growth Factors Review*, 19: s. 383-394
- Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W. & Weinberg, R.A. (1999): **Creation of human tumour cells with defined genetic elements.** *Nature*, 400(6743): p. 464-468
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G. & Bartek, J. (2008): **An Oncogene-induced DNA Damage, Model for Cancer Development.** *Science*, 319: p. 1352-1355
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000): **The Hallmarks of Cancer.** *Cell*, 100: s. 57-70
- Harley, C.B., Futcher, A.B. & Greider, C.W. (1990): **Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.** *Nature*, 345(6274): p. 458-460
- Harris, S.L. & Levine, A.J. (2005): **The p53 pathway: positive and negative feedback loops.** *Oncogene*, 24: p. 2899-2908
- Hayflick, L. & Moorhead, P.S. (1961): **The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.** *Experiments of Cell Research*, 25: p. 585-621
- Hayflick, L. (1977): **The cell biology of human aging.** *The New England Journal of Medicine*, 295(23): s. 1302-1308
- Kiesslich, A., von Mikecz, A. & Hemmerich, P. (2002): **Cell cycle-dependent association of PML bodies with sites of active transcription in nuclei of mammalian cells.** *The Journal of Structural Biology*, 140: s. 167-79
- Hofmann, T.G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H. & Schmitz, M.L. (2002): **Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase 2.** *Nature Cell Biology*, 4(1): s. 1-10
- Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C. & Taniguchi, T. (2005): **Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction.** *Nature*, 434: s. 1035-1040
- Huang L.C., Clarkin, K.C. & Wahl, M.W. (1996): **Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(10): p. 4827-4832
- Huang, M., Qian, F., Hu, Y., Ang, Ch., Li, Z. & Wen, Z. (2002): **Chromatin-remodelling factor BRG1 selectively activates a subset of interferon- α -inducible genes.** *Nature Cell Biology*, 4: p. 774-781
- Chan, J.Y.H., Li, L., Fan, Y.H., Mu, M.Z., Zhang, W.W. & Chang, K.S. (1997): **Cell-Cycle Regulation of DNA Damage-Induced Expression of the Suppressor Gene PML.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240: s. 640-646
- Chang, B.D., Xuan, Y., Broude, E.V., Zhu, H., Schott, B., Fang, J. & Roninson, I.B. (1999): **Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs.** *Oncogene*, 18: 4808-4818
- Chang, K.S., Fan, Y.H., Andreeff, M., Liu, J., Mu, Z.M. (1995): **The PML gene encodes a phosphoprotein associated with the nuclear matrix.** *Blood*, 85(12): s. 2646-2653
- Chandra, P., Zimmer, Ch. & Thrum, H. (1970): **Effect of distamycin A in the structure and template activity of DNA in RNA-polymerase system.** *FEBS Letters*, 7(1): s. 90-94
- Chelbi-Alix, M.K., Pelicano, L., Quignon, F., Koken, M.H., Venturini, L., Stadler, M., Pavlovic, J., Degos, L. & de Thé, H. (1995): **Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells.** *Leukemia*, 9(12): s. 2027-2030

- Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J.D., Yan, L.J. & Ames, B.N. (1995): **Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells.** *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10): 4337-4341
- Chini, C.C.S., Wood, J. & Chen, J. (2006): **Chk1 is required to maintain Claspin stability.** *Oncogene*, 25: p. 4165-4171
- Imada, K. & Leonard, W.J. (2000): **The Jak-STAT pathway.** *Molecular Immunology*, 37: s. 1-11
- Jacky, P.B., Beek, B. & Sutherland, G.R. (1983): **Fragile sites in chromosomes: possible model for the study of spontaneous chromosome breakage.** *Science*, 220(4592): s. 69-70
- Janderová-Rossmislová, L., Nováková, Z., Vlasáková, J., Philimonenko, V., Hozák, P. & Hodný, Z. (2007): **PML protein association with specific nucleolar structures differs in normal, tumor and senescent human cells.** *Journal of Structural Biology*, 159: s. 56-70
- Jensen, K., Shiels, C. & Freemont, P.S. (2001): **PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif.** *Onkogene*, 20: s. 7223-7233
- Jul-Larsen, Å., Grudic, A., Bjerkvig, R. & Bøe, S.O. (2009): **Cell-cycle regulation and dynamics of cytoplasmic compartments containing the promyelocytic leukemia protein and nucleoporins.** *Journal of Cell Science*, 122(8): s. 1201-1210
- Kamitani, S., Ohbayashi, N., Ikeda, O., Togi, S., Muromoto, R., Sekine, Y., Ohta, K., Ishiyama, H. & Matsuda, T. (2008): **KAP1 regulates type I interferon/STAT1-mediated IRF-1 gene expression.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370: s. 366-370
- Kastan, M.B. & Bartek, J. (2004): **Cell-cycle checkpoints and cancer.** *Nature*, 432: s. 316-323
- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Craig, R.W. (1991): **Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage.** *Cancer Research*, 51: s. 6304-6311
- Katakura, Y.E., Nakata, E., Miura, T. & Shirahata, S. (1999): **Transforming Growth Factor (Beta) Triggers Two Independent-Senescence Programs in Cancer Cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 255(1): s. 110-115
- Kaur, S., Lal, L., Sassano, A., Majchrzak-Kita, B., Srikanth, M., Baker, D.P., Petroulakis, E., Hay, N., Sonenberg, M., Fish, E.N. & Plataniias, L.C. (2007): **Regulatory Effect of Mammalian Target of Rapamycin-activated Pathways in Type I and II Interferon Signaling.** *The Journal of Biological Chemistry*, 282(3): p. 1757-1768
- Kaynor, C., Xin, M., Wakefield, J., Barsoum, J. & Qin, X.O. (2002): **Direct evidence that IFN-beta functions as a tumor-suppressor protein.** *The Journal of Interferon & Cytokine Research*, 22(11): 1089-1098
- Kim, Y., Gerlitz, G., Furusawa, T., Catez, F., Nussenzweig, A., Oh, K., Kraemer, K.H., Shiloh, H. & Bustin, M. (2009): **Activation of ATM depends on chromatin interactions occurring before induction of DNA damage.** *Nature Cell Biology*, 11(1): p. 92-96
- Kochs, G., Janzen, C., Hohenberg, H. & Haller, O. (2002): **Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5): s. 3153-3158
- Koken, M.H., Linarez-Cruz, G., Quignon, F., Viron, A., Chelbi-Alix, M.K., Sobczak-Thopot, J., Juhlin, L., Degos, L., Calvo, F. & de Thé, H. (1995): **The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis.** *Oncogene*, 10(7): s. 1315-1324
- Kruhlak, M.J., Celeste, A., Deltaille, G., Fernandez-Capetillo, O., Müller, W.G., McNally, J.G., Bazett-Jones, J.P. & Nussenzweig, A. (2006): **Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks.** *Journal of Cell Biology*, 172(6): p. 823-834
- Kröger, A., Köster, M., Schroeder, K., Hauser, H. & Mueller, P.P. (2002): **Activities of IRF-1.** *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 22: s. 5-14
- Kubbutat, M.H.G., Jones, S.N. & Vousden, K.H. (1997): **Regulation of p53 stability by MDM2.** *Nature*, 387: s. 299-303
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Douma, S., Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J. & Peeper, D.S. (2008): **Onkogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network.** *Cell*, 133: s. 1019-1031

- Kuong, K.J. & Kuzminov, A. (2009): **Cyanide, Peroxide and Nitric Oxide Formation in Solution of Hydroxyurea Causes Cellular Toxicity and May Contribute to Its Therapeutic Potency.** *Journal of Molecular Biology*, 390(5): s. 845-862
- Lavoie, J. & Drouin, R. (2001): **Lymphoblasts already in the DNA synthesis phase of the cell cycle can be reversibly arrested at the R/G transition.** *Chromosoma*, 110: p. 501-510
- Lee, H.C. & Wei, Y.H. (2007): **Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Mutation, and Apoptosis in Aging.** *Experimental Biology and Medicine*, s. 592-606
- Lehman, A.R. (2006): **Translesion synthesis in mammalian cells.** *Experimental Cell Research*, 312: s. 2673-2676
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1998): **Genetic instabilities in human cancer.** *Nature*, 395: s. 643-649
- Li, H. & Chen, J. D. (2000): **PML and the oncogenic domains in regulating transcriptional repression.** *Current Opinion in Cell Biology*, 12: p. 641-644
- Liao, J., Fu, Y. & Shuai, K. (2000): **Distinct roles of the NH₂- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10): p. 5267-5272
- Lim, D.S., Kim, S.T., Xu, B., Maser, R.S., Lin, J., Petrini, J.H. & Kastan, M.N. (2000): **ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway.** *Nature*, 404: s. 613-617
- Limoli, C.L., Kaplan, M.I., Phillips, J.W., Adair, G.M. & Morgan, W.F. (1996): **Differential Induction of Chromosomal Instability by DNA Strand-Breaking Agents.** *Cancer Research*, 57: p. 4048-4056
- Lin, A.W., Barradas, M., Stone, J.C., van Aelst, L., Serrano, M. & Lowe, W.S. (1998): **Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling.** *Genes and Development*, 12: p. 3008-3019
- Link, J.M. & Schroeder, H.W. (2002): **Clues to the etiology of autoimmune diseases through of analysis of immunoglobulin genes.** *Arthritis Research*, 4: s. 80-83
- Liu, S., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Lukas, C., Bartek, J. & Lukas, J. (2006): **Claspin Operates Downstream of TopBP1 To Direct ATR Signaling towards Chk1 Activation.** *Molecular and Cellular Biology*, 26(16): s. 6056-6064
- Liu, K.D., Gaffen, S.L. & Goldsmith, M.A. (1998): **Jak/STAT signalling by cytokine receptors.** *Current Opinion in Immunology*, 10: 271-278
- Lord, Ch.J. & Ashworth, A. (2007): **RAD51, BRCA2 and DNA repair: a partial resolution.** *Nature Structural and Molecular Biology*, 14: p. 461-462
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K. & Chen, J. (2005): **BRCA1 participates in DNA decatenation.** *Nature Structural and Molecular Biology*, 12(7): s. 289-293
- Louria-Hayon, Grossman, T., Sionov, R.V., Alsheich, O., Pandolfi, P.P. & Haupt, Y. (2003): **The Promyelocytic Leukemia Protein Protects p53 from Mdm2-mediated Inhibition and Degradation.** *The Journal of Biological Chemistry*, 278(35): s. 33134-33141
- Lowe, S.W., Cepero, E. & Evan, C.I. (2004): **Intrinsic tumour suppression.** *Nature*, 432: s. 307-315
- Lu, X., Ma, O., Nguyen, T.A., Jones, S.N., Oren, M. & Denekow, L.A. (2007): **The Wip1 Phosphatase Acts as a Gatekeeper in the p53-Mdm2 Autoregulatory Loop.** *Cancer Cell*, 12: s. 342-354
- Luciani, J.L., Depetris, D., Usson, Y., Metzler-Guillemain, C., Mignon-Ravix, C., Mitchell, M.J., Megarbane, A., Sarda, P., Sirma, H., Moncla, A., Feunten, J. & Mattei, M.G. (2006): **PML nuclear bodies are highly organised DNA-protein structures with a function in heterochromatin remodelling at the G2 phase.** *Journal of Cell Science*, 119: s. 2518-2531
- Lukas, J., Lukas, C. & Bartek, J. (2004): **Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time.** *DNA Repair*, 3: 997-1007
- Mabb, A.M., Wuerzberger-Davis, S.M. & Miyamoto, S. (2006): **PIASy mediates NEMO sumoylation and NF- κ B activation in response to genotoxic stress.** *Nature Cell Biology*, 8(9): s. 986-993
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuåsen, R.G., Welcker, M., Bartek, J. & Lukas, J. (2000): **Rapid Destruction of Human Cdc25A in Response to DNA damage.** *Science*, 288: s. 1425-1429

- Mallette, F.A. & Ferbeyre, G. (2007): **The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence.** *Cell Cycle*, 6: s. 1831-6.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald III, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S.P. & Elledge, S.J. (2007): **ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage.** *Science*, 316: s. 1160-1166
- McGowan, C.H. & Russell, C. (2004): **The DNA damage response: sensing and signaling.** *Current Opinion in Cell Biology*, 16: s. 629-633
- Mertens, F., Fletcher, C.D.M., Cin, P.D., Wever, I.D., Mandahl, N., Mitelman, F., Rosia, J., Rydholm, A., Scot, R., Tallini, G., Van den Berghe, H., Vanni, R. & Willén, H. (1998): **Cytogenetic Analysis of 46 Pleomorphic Soft Tissue Sarcomas and Correlation with Morphologic and Clinical Features.** *Genes, Chromosomes and Cancer*, 22: s. 16-25
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J. & Peeper, D.S. (2005): **BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi.** *Nature*, 436: s. 720-724
- Mistrik, M., Oplustilova, L., Lukas, J. & Bartek, J. (2009): **Low-dose DNA damage and replication stress responses quantified by optimized automated single-cell image analysis.** *Cell Cycle*, 8(16): s. 2592-2599
- Mochan, T.A., Venere, M., DiTullio, R.A. Jr. & Halazonetis, T.D. (2004): **53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage.** *DNA Repair*, 3: s. 945-952
- Moiseeva, O., Mallette, F.A., Mukhopadhyay, U.K., Moores, A. & Ferbeyre, G. (2006): **DNA Damage Signaling and p53-dependent Senescence after Prolonged {beta}-Interferon Stimulation.** *Molecular Biology of the Cell*: 34(9): 376-380.
- Morgan, C., Jenkins, G.J., Ashton, T., Griffiths, A.P., Baxter, J.N., Parry, E.M. & Parry, J.M. (2003): **Detection of p53 mutations in precancerous gastric tissues.** *The Journal of Cancer*, 89: s. 1314-1319
- Morris, S.M. (1991): **The genetic toxicity of 5-bromodeoxyuridin in mammalian cells.** *Mutation Research*, 258(2): s. 161-188
- Müller, S., Ledl, A. & Schmidt, D. (2004): **SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity.** *Oncogene*, 23: p- 1998-2008
- Mushinski, J.F., Nguxen, P.M., Stevens, L.M., Khanna, Ch., Lee, S., Chung, E.J., Lee, M.J., Kim, Y.S., Lineham, W.M., Horisberger, M.A. & Treper, J.B. (2009): **Inhibition of Tumor Cell Motility by the Interferon-inducible GTPase MxA.** *The Journal of Biological Chemistry*, 284(22): s. 15206-15214
- Nair, J.S., DaFonseca, C.J., Tjernberg, A., Sun, W., Darnell, J.E.Jr, Chait, B. & Zhang, J.J. (2002): **Requirement of Ca²⁺ and CaMKII for Stat1 Ser-727 phosphorylation in response to IFN-gamma.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9): 5971-5976
- Nakagawa, K. & Yokosawa, H. (2002): **PIAS3 induces SUMO-1 modification and transcriptional repression of IRF-1.** *FEBS Letters*, 530: s. 204-208
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M. & Li, A.W. (2003): **Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence.** *Cell*, 113: p. 703-716
- Niida, H. & Nakanishi, M. (2006): **DNA damage checkpoints in mammals.** *Mutagenesis*, 21(1): s. 3-9
- Nguyen, H., Ramana, C.V., Bayes, J. & Stark, G.R. (2001): **Roles of Phosphatidylinositol-3-Kinase in Interferon-γ-dependent Phosphorylation of STAT1 on Serine 727 and Activation of Gene Expression.** *The Journal of Biological Chemistry*, 278(36): 33361-33368
- Norkina, O., Dolganiuc, A., Catalano, D., Kodys, K., Mandrekar, P., Syed, A., Efros, M. & Szabo, G. (2008): **Acute Alcohol Intake Induces SOCS1 and SOCS3 and Inhibits Cytokine-Induced STAT1 and STAT3 Signaling in Human Monocytes.** *Clinical and Experimental Research*, 32(9): s. 1565-1573
- O'Brien, W., Stenman, G. & Sager, R. (1986): **Suppression of tumor growth by senescence in virally transformed human fibroblasts.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: p. 8659-8663

- O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V.L., Woods, C.G., Jeggo, P.A. & Goodship, J.A. (2003): **A splicing mutation affecting expression of ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome.** *Nature Genetics*, 33: s. 497-501
- Olovnikov, A.M. (1973): **A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymatic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon.** *The Journal of Theoretical Biology*, 41(1): s. 181-190
- Ortega, S., Malumbres, M. & Barbacid, M. (2002): Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1602: s. 73-87
- Pamment, J., Ramsay, E., Kelleher, M., Dornan, D. & Ball, K.L. (2002): **Regulation of the IRF-1 tumour modifier during the response to genotoxic stress involves an ATM-dependent signalling pathway.** *Oncogene*, 21: s. 7776-7785
- Pampin, M., Simonin, Y., Blondel, S., Percherancier, Y. & Chelbi-Alix, M.K. (2006): **Cross talk between PML and p53 during poliovirus infection: implication for antiviral defence.** *Journal of Virology*, 80: s. 8582-8592
- Pan, J.S., Hong, M.Z. & Ren, J.L. (2009): **Reactive oxygen species: A double-edged sword in oncogenesis.** *World Journal of Gastroenterology*, 15(14): p. 1702-1707
- Park, J., Seo, T., Kim, H. & Choe, J. (2005): **Sumoylation of the Novel Protein hRIP β Is Involved in Replication Protein A Deposition in PML Nuclear Bodies.** *Molecular and Cellular Biology*, 25(18): p. 8202-8214
- Pascal, T., Debacq-Chainiaux, F., Chrétien, A., Bastin, C., Dabée, A., Bertholet, V., Remacle, J. & Toussaint, O. (2005): **Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays.** *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 579: p. 3651-3659
- Paulovich, A.G., Armour, C.D. & Hartwell, L.H. (1998): **The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9, RAD17, RAD24 and MEC3 genes are required for tolerating irreparable, ultraviolet-induced DNA damage.** *Genetics*, 150: s. 70-93
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P.P. & Pelicci, P.G. (2000): **PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras.** *Nature*, 406: s. 207-210
- Pearson, M. & Pelicci, P.G. (2001): **PML interaction with p53 and its role in apoptosis and replicative senescence.** *Oncogene*, 20: s. 7250-7256
- Percherancier, Y., Germain-Desprez, D., Galisson, F., Mascle, X.H., Dianoux, L., Estephan, P., Chelbi-Alix, M.K. & Aubry, M. (2009): **Role of SUMO in RNF4-mediated PML sumoylation and phospho-switch control of its SUMO Binding Domain dissected in living cells.** *The Journal of Biological Chemistry*, manuscript
- Piazza, F., Gurrieri, C. & Pandolfi, P.P. (2001): **The theory of APL.** *Onkogene*, 20:s. 7216-7222
- Platanias, L.C. (2003): **The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling.** *Pharmacology and Therapeutics*, 98: p. 129-142
- Potmesil, M., Hsiang, Y.H., Liu, L.F., Bank, B., Grossberg, H., Kirschenbaum, S., Forlenzar, T.J., Penziner, A., Kanganis, D., Knowles, D., Traganos, F. & Silber, R. (1988): **Resistance of Human Leukemic and Normal Lymphocytes to Drug-induced DNA Cleavage and Low Levels of DNA Topoisomerase II.** *Cancer Research*, 48: p. 3537-3543
- Rao, V.A., Conti, C., Guirouilh-Barbat, J., Nakamura, A., Miao, Z.H., Davies, S.L., Saccá, B., Hickson, I.D., Bensimon, A. & Pommier, Y. (2007): **Endogenous γ H2AX-ATM-Chk2 Checkpoint Activation in Bloom's Syndrome Helicase-Deficient Cells Is Related to DNA Replication Arrested Forks.** *Molecular Cancer Research*, 5(7): s. 713-724
- Regad, T. & Chelbi-Alix, M.K. (2001): **Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections.** *Oncogene*, 20: p. 7274-7286
- Ressler, S., Bartková, J., Niederegger, H., Bartek, J., Scharffetter-Kochanek, K., Jansen-Dürr, P. & Wlaschek, M. (2006): **p16^{INK4} is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin.** *Aging cells*, 5: p. 379-389

- Robles, S.J. & Adami, G.R. (1998): **Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16^{INK4a} enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts.** *Oncogene*, 16: p.1113-1123
- Rodier, F., Coppé, J.P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A.M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R. & Campisi, J. (2009): **Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion.** *Nature Cell Biology*, 11(8): s. 973-981
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon C. & Bonner, W.M. (1999): **Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo.** *The Journal of Cell Biology*, 146: s. 905-916
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. & Bonner, W.M. (1998): **DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serin 139.** *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10): s. 5858-5868
- Rogers, R.S., Horwath, C.M. & Mutunis, M.J. (2003): **SUMO Modification of STAT1 and Its Roles in PIAS-mediated Inhibition of Gene Activation.** *The Journal of Biological Chemistry*, 278(32): p. 30091-30097
- Roninson, I.B. (2003): **Tumour Cell Senesce in Cancer Treatment.** *Cancer Research*, 63: p. 2705-2715
- Ronni, T., Sareneva, T., Pirhonen, J. & Julkunen, I. (1995): **Activation of IFN- α , IFN- γ , MxA a Interferon Regulatory Factor 1 Genes in Influeza A Virus-infected Human Peripehral Blood Mononuclear Cells.** *The Journal of Immunology*, 154(6): s. 2764-2774
- Rothenberg, M.L. (1997): **Topoisomerase I inhibitors: Review and update.** *Annals of Oncology*, 8: s. 837-855
- Saban, N. & Bujak, M. (2009): **Hydroxyurea and hydroxamic acid derivatives as antitumor drugs.** *Cancer Chemotherapy nad Pharmacology*, 64: s. 213-221
- Sager, R. (1991): **Senescence As a Model of Tumor Suppression.** *Environmental Health Perspectives*, 93: p. 59-62
- Salomoni, P., Bernardi, R., Bergmann, S., Changou, A., Tuttle, S. & Pandolfi, P.P. (2005): **The promyelocytic leukemia protein PML regulates c-Jun function in response to DNA damage.** *Blood*, 105(9): s. 3686-3690
- Sedelníková, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M. & Barrett, J.C. (2004): **Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks.** *Nature Cell Biology*, 6(2): s. 168-170
- Sedelníková, O.A., Nakamura, A., Kovalchuk, O., (2007): **DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three dimensional human models.** *Cancer Research*, 67: s. 4295-5302
- Scaglioni, P.P., Yung, T.M., Cai, L.F., Erdjument-Bromage, H., Kaufman, A.J., Singh, B., Teruya-Feldstein, J., Tempst, P. & Pandolfi, P.P. (2006): **A CK2-Dependent Mechanism for Degradation of the PML Tomur Suppressor.** *Cell*, 122: s. 269-283
- Serrano, M., Lin, W.A., McCurrach, M.E., Beach, D. & Lowe, S.W. (1997): **Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16^{INK4a}.** *Cell*, 88: p. 593-602
- Schär, P. (2004): **Spontaneous DNA damage, Genome Instability, and Cancer-When DNA Replication Escapes Control.** *Cell*, 104: s. 329-332
- Schulz, L.B., Chehab, N.H., Malikzay, A. & Halazonetis, T.D. (2000): **p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks.** *The Journal of Cell Biology*, 151: s. 1381-1390
- Sharpless, N.E. & DePinho, R.A. (2004): **Telomeres, stem cells, senescence, and cancer.** *Journal of Clinical Investigation*. 113: s. 160-168
- Shedden, K. & Cooper, S. (2002): **Analysis of cell-cycle-specific gene expression in human cells as determined by microarrays and double-thymidine block synchronization.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7): s. 4379-4384
- Shiloh, Y. (2004): **ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity.** *Nature Reviews Cancer*, 3: p. 155-168

- Shuai, K. (2006): **Regulation of cytokine signaling pathway by PIAS proteins.** *Cell Research*, 16: p. 196-202
- Schindler, C. (1999): **Cytokines and JAK-STAT signaling.** *Experimental Cell Research*, 253: s. 7-14
- Sinclair, D.A. & Oberdoerffer, P. (2009): **The ageing epigenome: Damaged beyond repair?** *Aging Research Reviews*, 8: 189-198
- Sörrensen, C.S., Syljuänsen, R.G., Lukas, J. & Bartek, J., (2004): **ATR, Claspin and the Rad9-Rad1-Hus1 Complex Regulated Chk1 and Cdc25A in the Absence of DNA damage.** *Cell Cycle*, 3(7): p. 941-945
- Stadler, M., Chelbi-Alix, M.K., Koken, M.H., Venturini, L., Lee, C., Saib, A., Quignon, F., Pelicano, L., Guillemin, M.C., Schindler, C. & de Thé, H. (1995): **Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated by through an ISRE and a GAS element.** *Oncogene*, 11: s. 2565-2573
- Staeheli, P., Danielos, P., Haller, O. & Sutcliffe, J.G. (1986): **Transcriptional Activation of the Mouse Mx Gene by the Type I Interferon.** *Molecular and Cellular Biology*, 6(12): s. 4770-4776
- Stanchina, E.d., Querido, E., Narita, M., Davuluri, R.V., Pandolfi, P.P., Ferbeyre, G. & Lowe, S.W. (2004): **PML Is a Direct p53 Target that Modulates p53 Effector Functions.** *Molecular Cell*, 13: s. 523-535
- Sternsdorf, T., Jensen, K. & Will, H. (1997): **Evidence for Covalent Modification of the Nuclear Dot-associated Proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1.** *The Journal of Cell Biology*, 139(7): p. 1621-1634
- Sun, Y., Xu, Y., Roy, K. & Price, B.D. (2007): **DNA Damage-Induced Acetylation of Lysine 3016 of ATM Activates ATM Kinase Activity.** *Molecular and Cellular Biology*, 27(24): p. 8502-8509
- Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., Negishi, H., Kikuchi, H., Sasaki, S., Imai, K., Shibue, T., Honda, K. & Taniguchi, T. (2003): **Integration of interferon- α/β signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence.** *Nature*, 424: s. 516-523
- Takeda, K. & Akira, S. (2000): **STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses.** *Cytokine & Growth Factor Review*, 11(3): s. 199-207
- Tanaka, N., Ishihara, M., Lamphier, M.S., Nozawa, H., Matsuyama, T., Mak, T.W., Aizawa, S., Tokino, T., Oren, M. & Taniguchi, T. (1996): **Cooperation of the tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage.** *Nature*, 382: s. 808-816
- Tapia-Aleval, C., Calonge, T.M. & O'Connell, M.J. (2009): **Regulation of CHK1.** *Cell Division*, 4(8): 1-24
- Tassioulas, I.X., Ho, H.H., Kashyap, Y., Paik, P., Hu, Y., Lowell, C.A. & Ivashkiv, L.: (2004): **Amplification of IFN- α -induced STAT1 activation and inflammatory function by Syk and ITAM-containing adaptors.** *Nature Immunology*, 5: s. 1181-1189
- Teixeira, M.R., Pandis, N., Bardi, G., Andersen, J.A. & Heim, S. (1996): **Karyotic Comparisons of Multiple Tumorous and Macroscopically Normal Surrounding Tissue Samples from Patients with Breast Cancer.** *Cancer Research*, 56: s. 855-859
- Telles, E., Hosing, A.S., Kundu, S.T., Venkatraman, P. & Dalal, S.N. (2009): **A novel pocket in 14-3-3 ϵ is required to mediate specific complex formation with Cdc25C and to inhibit cell cycle progression upon activation of checkpoint pathways.** *Experimental Cell Research*, 315(8): p. 1448-1457
- Tort, F., Bartková, J., Sehested, M., Ørntoft, T., Lukas, J. & Bartek, J. (2006): **Retinoblastoma Pathway Defects Show Differential Ability to Activate the Constitutive DNA Damage Response in Human Tumorigenesis.** *Cancer Research*, 66(21): s. 10258-10263
- Touny, L.H.K. & Banerjee, P.P. (2006): **Identification of Both Myt-1 and Wee-1 as Necessary Mediators of the p21-Independent Inactivation of the Cdc-2/CyclinB1 Complex and Growth Inhibition of TRAMP Cancer Cells by Genistein.** *The Prostate*, 66: p. 1542-1555
- Toussaint, O., Medrano, E.E. & von Zglinicki, T. (2000): **Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes.** *Experimental Gerontology*, 35: s. 927-945
- Townsend, P.A., Cragg, M.S., Davidson, S.M., McCormick, M., Barry, S., Lawrence, K.M., Knight, R.A., Hubank, M., Chen, P.L., Latchman, D.S. & Stephanou, A. (2005): **STAT1- facilitates the ATM**

- activated checkpoint pathway following DNA damage.** *The Journal of Cell Bioscience*, 118(8): p. 1629-1639
- Turkson, J. & Jove, R. (2000): **STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery.** *Oncogene*, 19: s. 6613-6626
- Uddin, S., Sassano, A., Deb, D.K., Verma, A., Majchrzak, B., Rahman, A., Malik, A.B., Fish, E.N. & Plataniias, L.C. (2002): **Protein Kinase C-delta (PKC-delta) Is Activated by Type I Interferons and Mediates Phosphorylation of Stat1 on Serin 727.** *The Journal of Biological Chemistry*, 277(17): 14408-14416
- Ungureanu, D., Vanhatupa, S., Kotaja, N., Yang, J., Aittomaki, S., Janne, O.A., Palvimo, J.J. & Silvennoinen, O. (2003): **PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1.** *Blood*, 102(9): s. 3311-3313
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L. & Shiloh, Y. (2003): **Recruitment of the MRN complex for ATM activation by DNA damage.** *The EMBO Journal*, 22(20): p. 5612-5621
- Vogelstein B. & Kinzler, K.W. (2004): **Cancer genes and pathways they control.** *Nature Medicine*, 10(8): s. 789-799
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., di Fagagna, F.A. & Jackson, S.P. (2005): **Human cell senescence as a DNA damage response.** *Mechanisms of Aging and Development*, 126: p. 111-117
- Wang, Z.G. (1998a): **Role of PML in Cell Growth and the Retinoic Acid Pathway.** *Science*, 279: p. 1547-1551
- Wang, Z.G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R. & Pandolfi, P.P. (1998b): **PML is essential for multiple apoptotic pathways.** *Nature Genetics*, 20(3): p. 220-222
- Ward, I.M., Minn, K., Jorda, K.G. & Chen, J. (2003): **Accumulation of Checkpoint Protein 53BP1 at DNA Breaks Involves Its Binding to Phosphorylated Histone H2AX.** *The Journal of Biological Chemistry*, 278(2): s. 19579-19582
- Wei, Y.H., Wu, S.B., Ma, Y.S. & Lee, H.Ch. (2009): **Respiratory Function Decline and DNA Mutation in Mitochondria, Oxidative Stress and Altered Gene Expression during Aging.** *Chang Gung Medical Journal*, 32(2): p. 113-132
- Weidtkamp-Peters, S., Lenser, T., Negorev, D., Gerstner, N., Hofmann, T.G., Schwanitz, G., Hoischen, Ch., Maul, G., Dittrich, P. & Hemmerich, P. (2008): **Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies.** *Journal of Cell Science*, 121: s. 2731-2743
- Wesoly, J., Szweykowska-Kulinska, Z. & Bluysen, H.A.R. (2007): **STAT activation and differential complex formation dictate selectivity of interferon responses.** *Acta Biochimica Polonica*, 54(1): p. 27-38
- White, E. (1996): **Life, death, and the pursuit of apoptosis.** *Genes Development*, 10: p. 1-15
- Xiao, A., Li, H., Shechter, D., Ahn, S.H., Fabrizio, L.A., Erdjument-Bromage, H., Ishibe-Murakami, S., Wang, B., Tempst, P., Hofmann, K., Patel, D.J., Elledge, S.J. & Alis, D.C. (2009): **WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity.** *Nature*, 457: s. 57-62
- Yamane, K., Wu, X. & Chen, J. (2002): **A DNA damage-regulated BRCT-containing protein, TopBP1, is required for cell survival.** *Molecular Cell Biology*, 22: s. 555-566
- Yang, C.H., Shi, W., Basu, L., Murti, A., Constantinescu, S.N., Blatt, L., Croze, E., Mullersman, J.E. & Pfeffer, L.M. (1996): **Direct Association of STAT3 with the IFNAR-1 Chain of the Human Type I Interferon Receptor.** *The Journal of the Biological Chemistry*, 271(14): s. 8057-8061
- Yeo, E.J., Whang, Y.C., Kang, C.M., Kim, I.H., Kim, D.I., Parka, J.S., Choy, H.E., Park, W.Y. & Park, S.C. (2000): **Senescence-like changes induced by hydroxyurea in human diploid fibroblasts.** *Experimental Gerontology*, 35: s. 553-571
- Yogev, O., Anzi, S., Inoue, K. & Shaulian, E. (2006): **Induction of Transcriptionally Active Jun Proteins Regulates Drug-induced Senescence.** *The Journal of Biological Chemistry*, 281(45): s. 34475-34483
- Yoo, H.Y., Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A. & Dunphy, W.G. (2009): **The Mre11-Rad50-Nbs1 Complex Mediates Activation of TopBP1 by ATM.** *Molecular Biology of the Cell*, 20: s. 2351-2360

- Yoshida, M., Hirinouchi, S. & Beppu, T. (1995): **Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function.** *Bioessays*, 17: s. 423-430
- Youlyouyz-Marfak, I., Gachard, N., Le Clorrence, C., Najjar, I., Baran-Marszak, F., Reminieras, L., May, E., Bornkamm, G.W., Fagard, R. & Feuillard, J. (2008): **Identification of a novel p53-dependent activation pathway of STAT1 by antitumour agents.** *Cell Death and Differentiation*, 15: p. 376-385
- Yu, J.H., Nakajima, A., Nakajima, H., Diller, L.R., Bloch, K.D. & Bloch, D.B. (2004): **Restoraion of Promyelocytic Leukemia Protein-Nuclear Bodies in Neuroblastoma Cells Enhances Retinoic Acid Responsivness.** *Cancer Research*, 64: p. 928-93
- Yu, X., Chini, C.C., He, M., Mer, G. & Chen, J. (2003): **The BRCT domain is a phospho-protein binding domain.** *Science*, 302: s. 639-642
- Zhang, R., Poustovoitov, M.V., Ye, X., Santos, H.A., Daganzo, S.M., Erzberger, J.B., Serebriiskii, I.G., Canutescu, A.A., Dunbrack, R.L., Pehrson, J.R., Berger, J.M., Kaufman, P.D. & Adams, P.D. (2005a): **Formation of MacroH2A-Containing Senescence-Associated Heterochromatin Foci and Senescence Driven by ASF1a and HIRA.** *Developmental Cell*, 8: s. 19-30
- Zhang, X., Li, J., Sejas, D.P. & Pang, Q. (2005b): **The ATM/p53/p21 Pathway Influences Cell Fate Decision between Apoptosis and Senescence in Reoxygenated Hematopoietic Progenitor Cells.** *The Journal of Biological Biochemistry*, 280(20): p. 19635-19640
- Zhang, X.N., Liu, J.X., Hu, Y.W., Chen, H. & Yuan, Z.H. (2006): **Hyper-activated IFR-1 and STAT1 contribute to enhance Interferon stimulated gene (ISG) expression by Interferon α and γ co-treatment in human hepatoma cells.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1759: p. 417-425
- Zhivotovsky, B. & Kroemer, G. (2004): **Apoptosis and genomic instability.** *Nature*, 5: s. 752-762
- Zhu, J. Woods, D., McMahon, M. & Bishop, J.M. (1998): **Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf.** *Genes and Development*, 12: s. 2997-3007
- Zou, L. & Edledge, S.J. (2002): **Sensing and signaling DNA damage: roles of Rad17 and Rad9 complexes in the cellular response to DNA damage.** *Harvey Lectures*, 97: 1-15